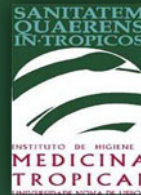




UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



## **MESTRADO EM PARASITOLOGIA MÉDICA**

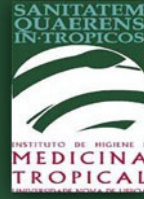
**Prevalência de parasitoses intestinais em crianças e  
funcionários de uma creche comunitária na comunidade  
“Entra A Pulso” da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil:  
detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp.  
através de técnicas de biologia molecular**

**ALEXANDRE MACIEL DA SILVA**

**LISBOA, 2010**



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



**Prevalência de parasitoses intestinais em crianças e  
funcionários de uma creche comunitária na comunidade  
“Entra A Pulso” da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil:  
detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp.  
através de técnicas de biologia molecular**

**ALEXANDRE MACIEL DA SILVA**

Tese apresentada para obtenção do grau  
de Mestre em Parasitologia Médica.

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Doutora Olga M<sup>a</sup> Guerreiro de Matos

**Co-orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Doutora Vláudia M<sup>a</sup> Assis Costa

## RESUMO

Apesar do crescente desenvolvimento científico e tecnológico observado nos últimos anos, as doenças parasitárias ainda constituem um importante problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. Este estudo tem como objetivo verificar a prevalência de parasitoses intestinais em crianças matriculadas na creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem, bem como os funcionários e seus filhos, para detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. através de técnicas de biologia molecular (*nested*-PCR/sequenciação de DNA). As amostras de fezes (94) foram obtidas de 58 crianças da creche, 18 funcionários e seus filhos (18). Estas amostras foram examinadas pelo método direto em esfregaços fecais após coloração com Lugol, utilizando o método modificado formol-éter. Para a identificação de *Cryptosporidium* as amostras foram coradas em lâmina pelo método Ziehl-Neelsen modificado (MT). Em amostras positivas por microscopia, o DNA dos ooquistos/quistos foi extraído pelo método Mini-BeadBeater/silica. As espécies e genótipos dos isolados identificados foram determinadas por *nested*-PCR de um fragmento da subunidade menor (SSU) do gene rRNA.

Para subsidiar os resultados obtidos dessa colheita foi utilizado também um questionário, o qual foi aplicado às mães e/ou responsáveis pelas crianças e aos funcionários, contendo a identificação do paciente e fatores predisponentes às parasitoses (tipo de abastecimento de água, destino do esgoto, possuir animais domésticos, higiene das mãos e pessoal).

Os resultados dos exames coprológicos evidenciaram que do total dos parasitados 43 (45,8%) eram positivos para pelo menos um parasita. sete (16,3%) eram funcionários e 36 (83,7%) eram crianças, sendo 27 (62,8%) do sexo feminino e 16 (37,2%) do sexo masculino, sem que fosse detectada diferença significativa entre os géneros. Em relação às espécies de parasitas, os dados evidenciaram

maior prevalência de *Cryptosporidium* spp. (53,4%) seguida de *Giardia* sp. (44,2%). A caracterização genética dos isolados evidenciaram presença de *C. parvum* e *Giardia duodenalis*.

Os resultados e os dados epidemiológicos obtidos, neste estudo, reforçam a importância do diagnóstico e controle das enteroparasitoses na população de crianças frequentadoras de instituições comunitárias assim como dos seus funcionários, representando, ainda, um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento.

### **PALAVRAS-CHAVE**

Enteroparasitos, Creche, *Giardia*, Genética, Protozooses, Protozoários

## ABSTRACT

Despite the growing scientific and technological development observed in recent years, the parasitic diseases still constitute a major public health problem, especially in developing countries. This study aims: to determine the prevalence of intestinal parasites in children enrolled in kindergarten Community Nossa Senhora de Boa Viagem, and the institution employees and their children; to detection and identification of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. through molecular biology techniques (*nested*-PCR).

Fecal samples (94) were obtained from 58 children of the daycare center, 18 staff members and their children (18). These samples were examined by direct and concentrated fecal smears, using a modified formol-ether method. Examination for enteric parasites was done by direct microscopy of a wet mount, following staining with Lugol's iodine. Air-dried smears of the deposit of all samples were stained by modified Ziehl-Neelsen (MZN) for *Cryptosporidium* identification. In samples that were positive by microscopy, (oo)cysts' DNA was extracted by a Mini-BeadBeater/silica method. The species and genotypes of the isolates identified were determined by *nested* PCR of a fragment of the small subunit (SSU) rRNA gene.

A questionnaire was administered to mothers and/or guardians and staff, containing the patient identification and factors predisposing to parasitic infections (type of water supply, sewage destination, owning pets, hands and personal hygiene).

A total of 43 (45,8%) people were infected with at least one parasite. Seven (16,3%) were employees and 36 (83,7%) were children; 27 (62,8%) were female and 16 (37,2%) male. For the species of parasites, the data showed a higher prevalence of *Cryptosporidium* spp. (53,4%) followed by *Giardia* sp. (44,2%). Genetic characterization of isolates showed the presence of *C. parvum* and *Giardia duodenalis*.

The results and epidemiological data obtained in this study reinforce the importance of diagnosis and of implementation of appropriate intervention strategies for the control of these parasitoses in the population of children attending Community institutions and their employees in developing countries.

**KEY WORDS**

Enteroparasites, Nursery, Giardia, Genetics, protozoan, protozoa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À *Deus*, pela saúde e pela força para a realização do presente estudo. Grande e eterno orientador de todos os meus projectos.

À *minha esposa*, pelo amor, confiança e incentivo; sem ela nenhum sonho seria possível ou valeria a pena.

À *minha família*, em especial aos meus pais, a quem devo minha formação moral, pelo incentivo e dedicação; pela certeza de que sempre estarão ao meu lado por mais difíceis que sejam os meus dias.

À *professora doutora Olga Matos*, que orientou o presente trabalho, agradeço pelo apoio, orientações e oportunidade que me concedeu.

Ao *Dr. Francisco Esteves, Dr<sup>a</sup> Vera Códices e Dr<sup>a</sup> Luiza Lobo*, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pelos momentos de descontração, pela amizade, pelo cozido à portuguesa e por terem me ajudado a concluir este trabalho, em especial à *Dr<sup>a</sup> Luiza Lobo*.

À *Ana Rosa e família*, pelo apoio e atenção dado durante estes meses que passei em Portugal, em especial à *Marta e Bruno* pelas bons momentos que passamos.

À *Sandra Maria*, directora da creche, que demonstrou seu apoio e confiança a este projecto, dando-nos prontamente todos os dados requeridos e organizando nossas entrevistas com os pais e responsáveis pelas crianças.

Àqueles que directo ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, e que me é impossível relatar individualmente. A cada um: o meu muito obrigado!

# SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	5
AGRADECIMENTOS	7
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE GRÁFICOS	11
LISTA DE QUADROS	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICAÇÃO	18
3. OBJETIVO	20
3.1. OBJETIVO GERAL.	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	20
4. REVISÃO DA LITERATURA	21
4.1. AS ENTEROPARASIToses: uma breve revisão.	21
4.2. <i>Giardia</i> : uma breve revisão.	23
4.2.1. Histórico.	23
4.2.2. Morfologia.	26
4.2.3. Ciclo de vida, Transmissão e Sintomatologia.	27
4.2.4. Taxonomia.	29
4.2.5. Epidemiologia.	32
4.2.6. Diagnostico e Tratamento.	36
4.3. <i>Cryptosporidium</i> spp.: uma breve revisão.	37
4.3.1. Histórico.	37
4.3.2. Morfologia.	39
4.3.3. Ciclo de vida, Transmissão e Sintomatologia.	39
4.3.4. Taxonomia.	44
4.3.5. Epidemiologia.	45
4.3.6. Diagnostico e Tratamento.	47
5. METODOLOGIA	50



5.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL E DA POPULAÇÃO EM ESTUDO.	50
5.2. AMOSTRAS DE FEZES COLHIDAS E ANALISADAS.	52
5.3. COLHEITA DE DADOS.	52
5.4. CONTROLO DE QUALIDADE.	52
5.5. ANÁLISE EM LABORATÓRIO.	53
5.5.1. CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS PELO MÉTODO DE SEDIMENTAÇÃO DIFÁSICA DE RITCHIE MODIFICADO (adaptado de Casemore <i>et al.</i> , 1985).	53
5.5.2. COLORAÇÃO COM SOLUÇÃO DE LUGOL – IDENTIFICAÇÃO DE QUISTOS DE <i>Giardia</i> sp. E DE OUTROS PROTOZOÁRIOS E OVOS DE HELMINTAS EM AMOSTRAS DE FEZES A FRESCO.	54
5.5.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.	54
5.5.3.1. EXTRAÇÃO DO DNA.	54
5.5.4. REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).	56
5.5.4.1. Amplificação por <i>nested</i> -PCR do gene $\beta$ -giardina.	56
5.5.4.2. Amplificação por <i>nested</i> -PCR do gene SSU rRNA.	59
5.5.4.3. Purificação e sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR.	60
5.5.4.4. Análise Bioinformática.	62
5.6. COLHEITA DOS DADOS ANTROPOMÉTRICOS.	62
5.7. ANÁLISE DOS DADOS.	63
5.8. ENTREGA DOS RESULTADOS.	64
5.9. ASPECTOS ÉTICOS.	64
5.10. ANÁLISE CRÍTICA DE RISCOS OU DESCONFORTO PARA POPULAÇÃO EM ESTUDO.	65
5.11. ANÁLISE CRÍTICA DE BENEFÍCIOS PARA A POPULAÇÃO EM ESTUDO.	65
6. RESULTADOS	66
7. DISCUSSÃO	77
8. CONCLUSÃO	92
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
10. ANEXOS	106
10.1. Questionário aplicado aos participantes deste estudo	106
10.2. Ficha do doente	107
10.3. Instruções para colheita de fezes	108
APÊNDICE A: FIGURAS	109

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida da <i>Giardia</i> sp. no homem (CDC).....	28
<b>Figura 2:</b> Prevalência de giardíase no Brasil, entre parasitoses gastrintestinais.....	33
<b>Figura 3:</b> Ciclos de transmissão de <i>Giardia</i> sp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	36
<b>Figura 4:</b> Ciclo biológico do <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	40
<b>Figura 5:</b> Gel de agarose a 2%, após electroforese dos produtos de amplificação do gene SSU-rRNA em isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp. M: marcador de pesos moleculares (100 pb ladder); linhas 1: produto de PCR do DNA extraído das fezes; linha 2: controlo positivo de DNA de <i>Cryptosporidium</i> ; linha 3: controlo negativo.....	75
<b>Figura 6:</b> Gel de agarose a 2%, após electroforese dos produtos de amplificação do gene $\beta$ -giardina em isolados de <i>Giardia</i> sp. M: marcador de pesos moleculares (100 pb ladder); linhas 1: produto de PCR do DNA extraído das fezes; linha 2: controlo positivo de DNA de <i>Giardia duodenalis</i> ; linha 3: controlo negativo. ....	76

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico I:** Prevalência das enteroparasitoses em relação ao gênero dos 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010.....67
- Gráfico II:** Presença de sintomas mais relatados pelos 43 participantes infectados da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010, e suas associações com os parasitas encontrados.....71
- Gráfico III:** Associação entre o uso de fármacos antiparasitários com a solicitação médica de exame coprológico e prevalência de enteroparasitoses entre os 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010..... 71
- Gráfico IV:** Distribuição dos distúrbios nutricionais encontrados nos 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010.....72
- Gráfico V:** Hábitos alimentares dos 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010.....72

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Espécies do género <i>Giardia</i> atualmente reconhecidas e seus respectivos hospedeiros .....	30
<b>Quadro 2:</b> Agrupamentos observados dentro da espécie <i>G. duodenalis</i> e seus respectivos hospedeiros.....	30
<b>Quadro 3:</b> Nova classificação de <i>Giardia</i> proposta por Monis <i>et al.</i> (2009) .....	32
<b>Quadro 4:</b> Espécies e principais hospedeiros de <i>Cryptosporidium</i> .....	45
<b>Quadro 5:</b> Características dos primers usados nas duas etapas de <i>nested</i> -PCR .....	57
<b>Quadro 6:</b> Condições térmicas de amplificação por <i>nested</i> -PCR do gene da $\beta$ -giardina. ....	58
<b>Quadro 7:</b> Características dos primers usados nas duas etapas de <i>nested</i> -PCR do gene SSU rRNA.....	59
<b>Quadro 8:</b> Condições de amplificação do DNA, para o gene SSU rRNA .....	60
<b>Quadro 9:</b> Prevalência das enteroparasitoses entre os 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010, e ocorrência de mono e poliparasitismo (poli) nos 43 participantes parasitados .....	67
<b>Quadro 10:</b> Prevalência das enteroparasitoses evidenciadas nos 43 participantes infectados da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010.....	68
<b>Quadro 11:</b> Prevalência das enteroparasitoses evidenciadas nos 43 pacientes infectados, segundo faixa etária, da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010.....	68
<b>Quadro 12:</b> Principais atributos epidemiológicos relacionados com as condições de higiene e saneamento dos 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010.....	72
<b>Quadro 13:</b> Distribuição dos enteroparasitas encontrados nos 43 parasitados da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem da comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010, de acordo com o estado nutricional .....	73

**Quadro 14:** Distribuição dos estados nutricionais encontrados nos 43 doentes parasitados da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem da comunidade Entra A Pulso, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de outubro de 2009 a julho de 2010, de acordo com a faixa etária e gênero .....73

# 1. INTRODUÇÃO

Apesar do crescente desenvolvimento científico e tecnológico observado nos últimos anos, as doenças parasitárias ainda constituem um importante problema de saúde pública (Chan, 1997). Esta situação é bastante comum, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde são frequentes as elevadas taxas de analfabetismo e o baixo nível socioeconômico da população, fatores estes associados às precárias condições de saneamento básico e higiene individual (Uchôa *et al.*, 2001).

As creches, por se tratarem de ambientes fechados, nos quais as crianças ficam a maior parte do dia, passam a ser um fator a mais de exposição às enteroparasitoses. O facto de frequentar creches é mais uma característica de nível socioeconómico desfavorável (Gurgel *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, têm-se registrado profundas mudanças na força de trabalho da população em diversas cidades, tendo como resultado um grande número de crianças sendo cuidadas fora do ambiente familiar, institucionalizadas em creches (Barros *et al.*, 1999). Em função da maior urbanização e maior participação feminina no mercado de trabalho, as creches passaram a ser o primeiro ambiente externo ao doméstico que a criança frequenta, tornando-se potenciais ambientes de contaminação (Gurgel *et al.*, 2005). Diarreias e gastrinterites são consideradas um importante problema de saúde pública em crianças atendidas nestas instituições (Cordell *et al.*, 1994). Apesar da alta frequência de parasitoses e da morbilidade causada à população em geral, e mais especificamente à população pediátrica, ressalta-se a escassez de estudos acerca do problema, visando um melhor dimensionamento e elaboração de medidas de combate por parte das autoridades sanitária (Cardoso *et al.*, 1995; Loureiro *et al.*, 1989; Machado *et al.*, 1999).

O estudo da parasitologia é fundamental, pois, as doenças parasitárias são frequentes na população mundial e pode levar o indivíduo à morte súbita, como ocorre, por exemplo, na doença de Chagas. Alguns parasitas representam grave problema de saúde pública, sendo, na maioria das

vezes, ao lado da má nutrição, os responsáveis por deficiência na aprendizagem das crianças e no desenvolvimento físico, podendo ocasionar incapacidade funcional. (Cimerman, 2008)

O tratamento eficiente das doenças parasitárias, bem como a prevenção e o controle de cada uma delas, exige bom conhecimento dos fenômenos ecológicos que envolvem o homem, os parasitas que o invadem e, eventualmente, os hospedeiros intermediários ou vetores desses parasitas (Rey, 2008).

A *Giardia duodenalis* é o protozoário intestinal patogênico de maior prevalência no mundo inteiro. A infecção pode ser sub-clínica ou causar diarreia aguda ou crônica além de quadros de constipação. Como os quistos de *Giardia* não são destruídos pelo cloro, a *Giardia* torna-se endêmica em reservatórios de água públicos que não são filtrados através de areia. (Cotran *et al.*, 2000)

Segundo Machado *et al.* (2001), durante o ciclo evolutivo, a *G. duodenalis* apresenta dois estágios de vida: a forma quística e a forma trofozoítica. O quisto é a forma mais infecciosa, pode permanecer viável na superfície da água por aproximadamente dois meses e é transmitida ao homem pela ingestão de água e alimentos contaminados com material fecal contendo esta forma de parasito.

A Organização Mundial da Saúde considerou a giardíase uma zoonose já em 1979. Porém, até hoje esta questão não está resolvida. Há relatos esparsos de transmissão zoonótica e pouca confirmação. O conhecimento de que há genótipos específicos de *Giardia* para determinado hospedeiro e genótipos comum de *Giardia* a humanos e vários animais, os chamados genótipos zoonóticos, têm mantido a discussão sobre giardíase ser ou não uma zoonose. (Paulino, 2005)

Embora somente uma espécie (*G. duodenalis*) tenha sido reconhecida como agente causador de doença em humanos e na maioria dos outros mamíferos, a caracterização molecular de exemplares de *Giardia* morfologicamente idênticos isolados de humanos e de várias outras espécies de mamíferos, tem confirmado a heterogeneidade deste parasita e fornecendo uma base para um entendimento mais claro da sua taxonomia e do seu potencial zoonótico. (Thompson *et al.*, 2000)

Entre os microrganismos emergentes, destacam-se os protozoários entéricos oportunistas, em especial os coccídios (Filo: Apicomplexa) e os microsporídios (Filo: Microsporidia), relatados como responsáveis por inúmeros casos patológicos, apresentando infecções refratárias ou incuráveis, com significativas causas de morte. Os coccídios intestinais de maior importância que infectam o trato intestinal humano são: *Isospora belli*, *Cryptosporidium* spp. e o *Cyclospora cayetanensis*. (Ortega *et al.*, 1993)

O *Cryptosporidium* spp. era considerado um patógeno oportunista que acometia apenas pessoas imunodeprimidas, mas o número de casos em indivíduos imunocompetentes vêm se tornando cada vez mais freqüente. Trata-se, na atualidade, de um patógeno intestinal distribuído em todo o mundo. Esta ocorrência é dependente de fatores que incluem o clima, a idade e outros aspectos demográficos de uma população (Palmer, 1990).

Estudos demonstram que a criptosporidiose é endêmica na maioria das regiões tropicais e que *Cryptosporidium* spp. é um dos três principais agentes de diarreia infecciosa que constitui importante causa de morbimortalidade em crianças de 0 a 5 anos de idade no Brasil (Oshiro *et al.*, 2000, Gatei *et al.*, 2003). Desta forma, assim como outros protozoários intestinais, *Cryptosporidium* spp., é cosmopolita, constituindo grande problema de saúde pública durante a infância, se forem considerados os danos que pode ocasionar ao desenvolvimento físico da criança. A exposição da criança ao agente ocorreria durante ou logo após o desmame, sendo as crianças menores de 3 anos de idade as mais suscetíveis a infecção (Griffiths, 1997; Agnew, *et al.*, 1998, Guerrant *et al.*, 1999; Newman *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2000).

As creches, por se tratarem de ambientes fechados, nos quais as crianças ficam a maior parte do dia, passam a ser um fator a mais de exposição às enteroparasitoses. O fato de freqüentar creches é mais uma característica de nível sócioeconômico desfavorável. A maior urbanização e a maior participação feminina no mercado de trabalho fizeram com que estes ambientes passassem a ser, depois do ambiente doméstico, o primeiro espaço externo que a criança freqüenta.



Este trabalho teve como objetivo principal verificar a prevalência de parasitoses intestinais, em especial *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp., em crianças matriculadas na creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem, bem como dos funcionários e seus filhos, localizada na comunidade “Entra A Pulso” no bairro de Boa Viagem da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil.

## 2. JUSTIFICAÇÃO

As enteroparasitoses são um grave problema de saúde pública, principalmente entre pré-escolares e escolares, nos quais pode determinar emagrecimento, diarreia, dificuldade na aprendizagem e no crescimento, estando a sua transmissão associada à carência de hábitos higiênicos, saneamento básico e intenso contacto pessoa-a-pessoa favorecido por ambientes fechados (Uchôa *et al.*, 2004). As creches são instituições onde as crianças permanecem, na maioria das vezes, o dia todo e que além de necessárias socialmente, são relevantes do ponto de vista epidemiológico. A OMS considera as creches como Instituição adequada para a promoção do crescimento e desenvolvimento da criança. Nos países em desenvolvimento, as creches são instituições que protegem as crianças empobrecidas das injúrias propiciadas pelo meio. As creches têm sido utilizadas em muitos países para promover a saúde das crianças que vivem em situação de pobreza (Silva *et al.*, 2000), no entanto, vários pesquisadores têm voltado a atenção para as creches no que diz respeito às condições favoráveis para a transmissão de enteroparasitoses intestinais (Barçante *et al.*, 2008; Zaiden *et al.*, 2008; Biscegli *et al.*, 2009).

Entre as enteroparasitoses, os surtos diarreicos são frequentes, como é o caso de *Giardia duodenalis* que pode ocasionar um quadro de diarreia aguda e auto-limitante ou um quadro de diarreia persistente, como evidências de má absorção e perda de peso. O protozoário *Cryptosporidium* spp. também causa lesão da mucosa do intestino delgado e alteração da absorção de nutrientes por diversos mecanismos (Neves, 2005). Ainda hoje, a diarreia é um problema de saúde pública devido à sua alta incidência com repercussões negativas sobre o crescimento pondero-estatural das crianças acarretando número levado de hospitalizações e implicando em taxas importantes de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças pertencentes à famílias de baixa renda. Na literatura há inúmeros relatos de parasitismo intestinal por *Giardia* e

*Cryptosporidium* spp. em crianças que frequentam creches (Machado *et al.*, 1999; Barçante *et al.*, 2008; Zaiden *et al.*, 2008; Biscegli *et al.*, 2009) destacando assim a importância de se estudar este tipo de instituição, bem como o desenvolvimento de atividades que reduzam a incidência destes agentes. Assim, justifica-se o interesse pela pesquisa em questão.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. OBJETIVO GERAL.

Verificar a prevalência de parasitoses intestinais, em especial *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp., em crianças matriculadas na creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem, funcionários e seus filhos, localizada na comunidade “Entra A Pulso” no bairro de Boa Viagem da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Identificar os protozoários e helmintas mais prevalentes;
- Verificar o índice de monoparasitismo e poliparasitismo;
- Identificar a prevalência dos enteroparasitas segundo a faixa etária;
- Identificar a prevalência dos enteroparasitas entre os sexos;
- Determinar, por *nested*-PCR, a presença de DNA de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes dos participantes da pesquisa;
- Relacionar *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. com a sintomatologia do paciente;
- Relacionar as condições de saneamento básico, esgotamento sanitário, hábitos alimentares, hábitos higiênicos e presença de animais de estimação com a prevalência de parasitismo;
- Relacionar as possíveis associações entre a ocorrência de enteroparasitas e o estado nutricional dos participantes da pesquisa;

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1. AS ENTEROPARASIToses: uma breve revisão.

As enteroparasitoses ou parasitoses intestinais são doenças advindas da associação entre seres vivos, em que existe unilateralidade de benefícios, sendo um dos associados prejudicados pela associação (Neves, 2005). Constituem um grave problema de saúde pública, tornando-se uns dos principais fatores debilitantes da população e, como consequência, temos o comprometimento do desenvolvimento físico e intelectual das crianças, principalmente na menor faixa etária (Chaves, 2006). Elas são relatadas mundialmente (pandémico) embora a incidência dos agentes etiológicos varie entre os continentes, devido às diferenças culturais, sociais, climáticas e ambientais.

Para o desenvolvimento das parasitoses, segundo Neves (2005), há necessidade de alguns fatores, tanto relacionados aos parasitas como aos hospedeiros. Nos inerentes aos parasitas citam-se o número de exemplares, o tamanho, a localização no hospedeiro e a virulência, isto é, a severidade e rapidez com que um agente etiológico age sobre o hospedeiro. Em relação ao hospedeiro, consideram-se a idade (alertando que as crianças são mais susceptíveis à doença parasitária), a imunidade, a nutrição, os hábitos e costumes e o uso geral de medicamentos. Da combinação desses fatores poderemos ter “doentes” e “portador assintomático”.

Ao apresentar a relação entre parasitas, homem e sociedade, o autor faz referência de que, no meio tropical, as doenças parasitárias são graves e constantes e são consequência do subdesenvolvimento, sendo chamadas, pejorativamente, de doenças tropicais. No entanto, questiona essa afirmação de que sejam doenças tropicais, considerando que no Brasil, país tropical, essas doenças ocorrem nas camadas sociais pobres, sem condições adequadas de trabalho, de educação, de moradia e sanitárias, sendo esporádicas ou acidentais nas classes sociais elevadas. Por outro

lado, considera que em países desenvolvidos, de clima frio, como a Inglaterra, essas doenças foram sério problema de Saúde Pública, há cerca de 100 anos atrás, tendo sido controladas não por mudança de clima, mas por terem desenvolvido a educação, incentivando a participação popular e implementando medidas sanitárias eficientes.

As enteroparasitoses são provocadas por endoparasitas (parasitas que vivem dentro do corpo do hospedeiro), que são representados por protozoários e helmintos e que habitam normalmente o intestino do hospedeiro, em diferentes níveis (Vitor, 2000).

A transmissão das enteroparasitoses ocorre na maioria dos casos por via passiva oral, com a ingestão de água ou alimentos contaminados com as estruturas parasitárias libertadas por esses agentes, sendo a sua maior prevalência vinculada a áreas que se apresentam com condições higiênico-sanitárias precárias associadas à falta de tratamento adequado de água e esgoto. Estes fatores facilitam a disseminação de ovos, quistos e larvas, sendo a transmissão também facilitada pelo aumento do contato pessoa-pessoa propiciado pelos ambientes fechados como asilos e creches, pois o grande número de indivíduos presentes nesses ambientes não permite, muitas vezes, obedecer às normas de higiene e assim, contribuem para o alto grau de enteroparasitismo (Cardoso *et al.*, 1995). Outro fato observado é que o ambiente coletivo proporciona uma maior probabilidade de adquirirem infecção, tendo em vista a possibilidade de um grande número de crianças estarem parasitadas, o que provavelmente condiciona a um alto risco de contaminação a toda população exposta a esse convívio (Nunes *et al.*, 1997).

Nas protozooses intestinais, o problema da carga infectante é minorado pela capacidade de replicação parasitária no organismo do hospedeiro. Nesses, os quistos libertados juntamente com as fezes já são infectantes, o que facilita a transmissão pessoa-a-pessoa ou até mesmo a auto-infecção. *G. duodenalis* é geralmente o protozoário mais prevalente entre as crianças com ou sem a associação com outros agentes, incidindo mais em crianças com idades entre 2 e 4 anos, devido aos precários hábitos de higiene próprios da idade, como colocar a mão suja na boca ou não lavar as mãos antes das refeições ou após evacuarem. (Saturnino *et al.*, 2003)

Os helmintas são, geralmente, encontrados em menor número, uma vez que o ovo ou larva, que são liberados juntamente com as fezes do indivíduo, em algumas espécies necessita passar pelo solo para que haja seu desenvolvimento para se tornarem infectantes. Dentre os helmintas *Ascaris lumbricoides* é o mais prevalente, seguido por *Trichuris trichiura* estando em vários casos associados em parasitismo, uma vez que as condições exigidas para o desenvolvimento dos seus ovos são semelhantes. (Saturnino *et al.*, 2003)

## **4.2. *Giardia*: uma breve revisão.**

### **4.2.1. Histórico.**

*Giardia* é um protozoário flagelado que parasita o intestino de quase todas as classes de vertebrados, sendo responsável pela doença chamada giardíase, que afeta principalmente crianças de países em desenvolvimento (Thompson, 2004; Monis *et al.*, 2009).

Trata-se de um microrganismo anaeróbio, porém aerotolerante, de organização celular simples, com ausência de mitocôndrias e peroxissomas, mas com um sistema secretório vesicular primitivo (Thompson, 2004).

Segundo Monis *et al.* (2009), a filogenia desse protozoário ainda é controversa e pode ser explicada por duas teorias diferentes. Uma sugere que a *Giardia* pertence a uma linhagem de eucariotas que divergiu antes da aquisição da mitocôndria (Thompson & Monis, 2004), e a outra propõe que esse protozoário pertence a uma linhagem de eucariotos que se adaptou a condições microaerofílicas (Morrison *et al.*, 2007).

Esse microrganismo foi observado pela primeira vez por Antony van Leeuwenhoek (1681), mas somente em 1859 foi descrito detalhadamente por Vilem Lambl. A seguir, foi relatado em coelhos por Davaine (1875) e em anfíbios por Kunstler (1882) (citados por Faubert, 2000; Thompson, 2004; Monis *et al.*, 2009).

Mais de 50 espécies de *Giardia* já foram descritas principalmente com base na ocorrência em um determinado hospedeiro, no entanto, em 1952, Filice (citado por Thompson, 2004; Monis *et al.*, 2009) propôs uma nova divisão, baseada em características morfológicas distinguíveis por meio de microscópio óptico, mais especificamente, a forma dos corpos medianos e o formato e comprimento do trofozoíto. Assim, três espécies passaram a ser reconhecidas: *G. duodenalis*, *G. agilis* e *G. muris*.

O conhecimento a respeito do género *Giardia* aumentou amplamente na década de 70. Nesse período foi publicado um estudo clínico, no qual os autores detectaram malabsorção e alteração de determinada parte do intestino em indivíduos dos quais esse patógeno havia sido isolado (Faubert, 2000).

Devido a associação entre castores infectados e surtos de giardíase em humanos, provocados pela utilização de água onde localizavam-se tais animais, *Giardia* passou a ser considerada um parasita zoonótico. Além disso, foi adicionada à lista de patógenos parasitários (WHO, 1979 e 1981).

Anos mais tarde, com o emprego do microscópio eletrônico, outras espécies de *Giardia* foram descritas: *G. psittaci*, *G. microti* e *G. ardeae* (Erlandsen e Bemrick, 1987; Feely, 1988; Erlandsen *et al.* 1990a).

Estudos de transmissão cruzada foram realizados com o objetivo de entender melhor a especificidade de certos isolados de *Giardia* a um hospedeiro e a questão de giardíase como uma zoonose. No entanto, uma limitação desses trabalhos foi o uso de isolados de *Giardia* não caracterizados geneticamente (Thompson, 2004; Monis *et al.*, 2009).

A possibilidade de realizar cultura "*in vitro*" de isolados de *Giardia* foi um grande avanço para o estudo desse parasita, pois forneceu material suficiente para a caracterização genética pela técnica de análise de isoenzimas. No entanto, uma dificuldade encontrada na aplicação dessa técnica é o facto de nem todos os isolados crescerem em tais culturas, o que dificultou a obtenção de dados representativos (Thompson, 2004).



Apesar da limitação da técnica anteriormente relatada, sua aplicação, em conjunto com procedimentos de análise de DNA, revelou diferenças genéticas entre os isolados da espécie *G. duodenalis*, que embora apresentassem semelhança morfológica, passaram a ser enquadrados em grupos, nomeados 1, 2 e 3 na América do Norte, "Polaco" e "Belga" na Europa, e ainda *Assemblages* (agrupamentos) A e B na Austrália (Nash *et al.*, 1985; Homan *et al.*, 1992; Mayrhofer *et al.*, 1995).

Anos mais tarde a heterogeneidade genética em *G. duodenalis* foi confirmada, e, além disso, foi observado que os isolados pertencentes aos grupos "Polaco", 1, 2 e *Assemblage* A eram correspondentes, assim como os grupos "Belga", 3 e *Assemblage* B (Monis *et al.*, 1996).

Outros autores relataram a existência de isolados de *G. duodenalis* que apresentavam diferenças genéticas em relação aos grupos previamente detectados e que pareciam ser específicos a determinados hospedeiros, sendo esses: *Assemblage* C e D, em cães; E em bovinos, ovinos e suínos; F, em gato e G, em rato doméstico (Hopkins *et al.*, 1997; Ey *et al.*, 1997; Monis *et al.*, 1998; Monis *et al.*, 1999).

Dentre os nomes citados acima, utilizados para elucidar a heterogeneidade existente em *G. duodenalis*, o termo *Assemblage* (agrupamento) parece ter maior aceitação entre os investigadores, e por essa razão foi adotado nesse trabalho.

Embora a microscopia e os métodos baseados em imunologia sejam reconhecidos na detecção de *Giardia* em amostras clínicas e ambientais, a recente aplicação das técnicas moleculares, que são altamente sensíveis e específicas, tem possibilitado a caracterização genética dos isolados de *Giardia*, auxiliando na taxonomia e na epidemiologia desse protozoário (Monis e Andrews, 1998; Thompson, 2004).

Outro aspecto relevante sobre esse parasita deu-se em 2004, com a sua inclusão na "Iniciativa de Doenças Negligenciadas" da Organização Mundial da Saúde, que busca estratégias de controlo para doenças que ocorrem principalmente em países em desenvolvimento (Savioli *et al.*, 2006).

Por fim, um destaque no estudo desse microrganismo deu-se recentemente, com o trabalho de Morrison *et al.* (2007), que sequenciaram o genoma de *G. duodenalis* WB clone C6 (ATCC 50803), cujo tamanho é de 11,7MB, distribuído em cinco cromossomos. Embora os dados publicados por esses autores contribuam para melhor conhecimento desse protozoário, também levantam questões para as quais serão necessários estudos futuros, tais como o número e a distribuição de íntrons, a manutenção de homozigotia apesar da existência de dois núcleos e a função dos genes descobertos.

#### 4.2.2. Morfologia.

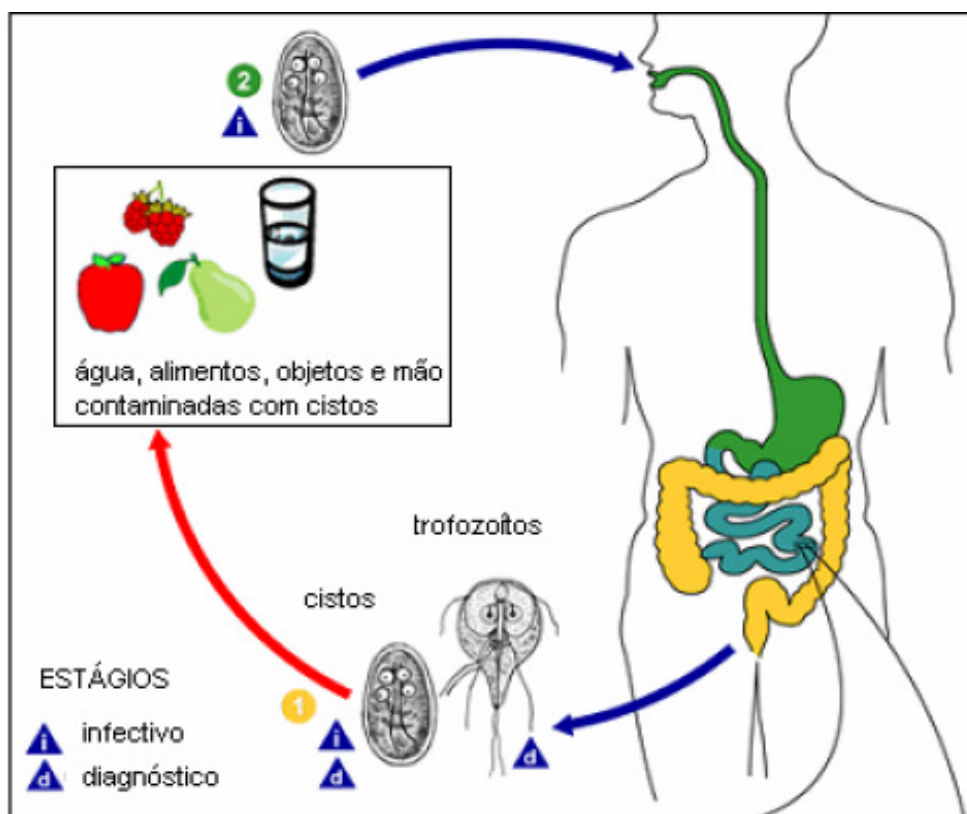
*Giardia duodenalis* (sinonímia: *G. intestinalis* e *G. lamblia*) é um pequeno protozoário, flagelado, que durante o seu ciclo vital apresenta duas formas: trofozoíto e quisto.

A forma de trofozoíto, é a forma móvel do parasita, medindo 12 a 15µm de comprimento por 6 a 8µm de largura, tem simetria bilateral e contorno piriforme, quando vista de face. O corpo, bastante deformável, mostra um achatamento dorsoventral. Na superfície ventral há uma área ovóide que constitui um disco adesivo ou disco suctorial, que ocupa os dois terços dessa face; ele é sustentado internamente por placas estriadas e circunscrito externamente por um delicado rebordo. Os trofozoítos vivem no duodeno e primeiras porções do jejuno, sendo por vezes encontrados nos condutos biliares e na vesícula biliar. A atividade dos flagelos imprime-lhes um movimento rápido e irregular, como que às sacudidas. Aderem à superfície da mucosa graças ao disco adesivo que possuem. (Rey, 2008)

O quisto, forma de resistência do parasita e infectante para os hospedeiros, é elipsóide ou ovóide, medindo cerca 12µm de comprimento por 8µm de largura. Quando corado pode mostrar uma delicada membrana destacada do citoplasma (Neves, 2005). Dentro do quisto são visíveis: dois a quatro núcleos (dependendo se a divisão nuclear ocorreu e foi completa), corpos basais, corpos medianos e elementos estruturais do disco ventral e flagelos (Adam, 2001).

### 4.2.3. Ciclo de vida, Transmissão e Sintomatologia.

O hospedeiro infecta-se ingerindo quistos de *Giardia* presentes na água ou alimentos contaminados ou por contato interpessoal. Após a ingestão, os quistos passam pelo ambiente ácido do estômago e desenquistam na porção inicial do intestino delgado. De cada quisto saem dois trofozoítos unidos pelo citoplasma que imediatamente se divide separando-os. Cada trofozoíto fixa-se na mucosa intestinal (duodeno e jejuno) e divide-se por divisão binária. Cada novo parasita produzido repete o processo de modo que em pouco tempo são produzidos vários deles. Depois, alguns destes trofozoítos desprendem-se da mucosa e iniciam o processo de enquistamento na porção final do intestino delgado. Inicialmente os flagelos encurtam-se, depois o citoplasma condensa-se e há produção de uma membrana quística. Quistos recentemente formados têm dois núcleos, mas depois há divisão nuclear no interior do quisto e são formados quatro núcleos. Logo após, o disco de adesão, corpos basais, corpos medianos e o aparelho locomotor (flagelos) são duplicados resultando dois trofozoítos que permanecem ligados pelo citoplasma no interior do quisto. Estes quistos são eliminados do corpo do hospedeiro juntamente com as suas fezes podendo contaminar as mãos da pessoa parasitada, os alimentos e a água. No ambiente os quistos resistem até dois meses se as condições de temperatura e humidade forem favoráveis. Não se sabe se todos os quistos eliminados nas fezes são prontamente infectantes, há evidência de que quistos de *Giardia* podem levar até sete dias para se tornarem maduros e infectantes. Convém ressaltar que em fezes liquefeitas (diarreicas) somente o trofozoíto é encontrado, mas em fezes sólidas predominam os quistos. Em uma única evacuação podem ser encontrados milhões ou bilhões de quistos. Sabe-se também que alguns dos trofozoítos eliminados no material diarreico podem originar infecção caso sobrevivam à ação da secreção gástrica (Schmidt & Roberts, 1981; Thompson *et al.*, 1990; Meyer, 1990; Adam, 2001). A figura (1) ilustra o ciclo da *Giardia* sp. no hospedeiro humano.



**Figura 1:** Ciclo de vida da *Giardia* no homem (CDC ([www.medicine.mcgill.ca](http://www.medicine.mcgill.ca)))/(adaptado))

O diagnóstico da infecção é feito pela detecção de quistos e trofozoítos nas fezes do hospedeiro. A técnica mais utilizada para tal é a microscopia, embora existam outras, como os imunodiagnósticos e a PCR (Thompson, 2004; Savioli *et al.*, 2006).

Os portadores desse protozoário podem ser assintomáticos ou sintomáticos, e nesses últimos os principais sintomas são diarreia aguda ou crônica, dor abdominal, perda de peso, desidratação, má absorção dos nutrientes, fadiga e crescimento e desenvolvimento cognitivo afetado, no caso de crianças. A severidade da doença dependerá dos fatores de virulência do parasita, da idade, estado imunológico e nutricional do hospedeiro e do número de quistos ingeridos (Faubert, 2000; Thompson, 2004; Savioli *et al.*, 2006).

Ainda não se sabe porque alguns indivíduos apresentam manifestações clínicas e outros não (Savioli *et al.*, 2006). No entanto, foi observado que a pesar de não se conhecer nenhum fator de virulência ou toxina, é possível que a expressão variável de proteínas superficiais possibilitem

evasão de respostas imunes do hospedeiro e adaptação a diferentes ambientes (Morrison *et al.*, 2007; Monis *et al.*, 2009).

Alguns pesquisadores estudaram a relação entre o genótipo responsável pela infecção e os sintomas apresentados pelo hospedeiro.

Homan e Mank (2001) encontraram associação do agrupamento A com diarreia intermitente e do B com diarreia persistente. Read *et al.* (2002), relataram que crianças infectadas pelo agrupamento A apresentavam maior probabilidade de ter diarreia do que as que abrigavam o agrupamento B. Em outros dois trabalhos o agrupamento A foi associado a sintomas de diarreia e B a infecções assintomáticas (Aydin *et al.*, 2004; Haque *et al.*, 2005). Por fim, Gelanew *et al.*, em 2007, observaram que o agrupamento B estava mais associado a infecções sintomáticas do que o A. Por outro lado, esse tipo de associação não foi observada em outras pesquisas (Hopkins *et al.*, 1997; Lalle *et al.*, 2005a), de modo que os autores concordam que estudos futuros a esse respeito sejam necessários.

#### **4.2.4. Taxonomia.**

Devido a novas informações geradas sobre os protozoários, principalmente, pela microscopia eletrônica, a Sociedade de Protozoologistas, grupo liderado por Levine, fez uma revisão da classificação de Honigbert *et al.* (1964) e propôs um novo esquema de classificação para estes organismos. Esta classificação proposta por Levine *et al.* (1980) foi adotada pela comunidade científica como a última classificação oficial dos protozoários.

Quanto aos protozoários do género *Giardia*, sua classificação segundo Levine *et al.* (1980), seria a seguinte: Reino Protista, Filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida e Família Hexamitidae.

Mais de 50 espécies de *Giardia* já foram descritas, mas atualmente são reconhecidas apenas seis espécies: *G. duodenalis*, *G. agilis*, *G. muris*, *G. ardeae*, *G. psittaci* e *G. microti*. O Quadro 1

mostra as espécies de *Giardia* reconhecidas atualmente e seus respectivos hospedeiros. (Thompson, 2004)

**Quadro 1:** Espécies do género *Giardia* atualmente reconhecidas e seus respectivos hospedeiros.

Espécie	Hospedeiro
<i>G. duodenalis</i>	Homem e Mamíferos domésticos e silvestres
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores

Fonte: THOMPSON, 2004 (adaptado)

A maioria das espécies de *Giardia* está adaptada a determinado tipo de hospedeiro, porém *G. duodenalis* é exceção, pois infecta várias espécies de mamíferos. A aplicação de técnicas moleculares em estudos com esta espécie tem revelado diversidade genética intra-específica (Thompson *et al.*, 2000; Thompson, 2004; Appelbee *et al.*, 2005). O Quadro 2 mostra os sete agrupamentos de *G. duodenalis* e seus respectivos hospedeiros.

**Quadro 2:** Agrupamentos observados dentro da espécie *G. duodenalis* e seus respectivos hospedeiros.

Agrupamento	Hospedeiros	Fonte
<b>A</b>	Homem, bovinos, gato, cão, castor	Homan <i>et al.</i> , 1992; Nash <i>et al.</i> , 1995; Mayrhofer <i>et al.</i> , 1995; Monis <i>et al.</i> , 1996
<b>B</b>	Homem, cão, castor, rato	
<b>C</b>	Cão	Hopckins <i>et al.</i> , 1997; Monis <i>et al.</i> , 1998
<b>D</b>	Cão	
<b>E</b>	Bovinos, ovinos, suínos	Ey <i>et al.</i> , 1997; Monis <i>et al.</i> , 1999
<b>F</b>	Gato	Monis <i>et al.</i> , 1999; Appelbee <i>et al.</i> , 2005
<b>G</b>	Rato doméstico	

Fonte: THOMPSON, 2004 (adaptado)

Os estudos moleculares também revelaram a existência de diversidade genética dentro de cada agrupamento. O agrupamento A (*Assemblage A*) consiste em isolados que podem ser reunidos em dois sub-agrupamentos distintos. Estes grupos têm também sido designados por diferentes pseudónimos, mas os termos sub-agrupamento A-I e A-II são os preferidos. O sub-agrupamento A-I consiste em uma mistura de parasitas isolados de humanos e de animais, os quais são muito relacionados, e parecem ter sofrido uma dispersão global recente. Este sub-agrupamento tem sido alvo de estudo na análise do potencial de transmissão zoonótica da *Giardia*. O sub-agrupamento A-II é composto exclusivamente de parasitas isolados de humanos. O agrupamento B (*Assemblage B*) contém um grupo geneticamente diverso de parasitas isolados, predominantemente, de humanos, embora alguns genótipos de *Giardia* de animais tenham sido incluídos. Os níveis de diversidade genética neste grupo são muito maiores do que aqueles encontrados no agrupamento A (*Assemblage A*) e muitos dos grupos genéticos diferentes, consistem somente de isolados individuais. A distância genética maior, separando indivíduos com genótipos únicos, sugere que o agrupamento B (*Assemblage B*) contém linhagens genéticas mais antigas do que aquelas encontradas no agrupamento A (*Assemblage A*). (Thompson *et al.*, 2000)

Ainda, em relação aos agrupamentos A e B, a distância genética que divide os dois grupos é maior que a usada para separar algumas espécies de protozoários, de modo que, há alguns anos, é considerada a possibilidade de serem espécies diferentes (Thompson e Monis, 2004). No entanto, foi só recentemente que Monis *et al.* (2009) propuseram uma revisão da taxonomia desse protozoário, separando os diferentes agrupamentos de *G. duodenalis* em novas espécies, revisão essa justificada por duas razões: a necessidade de reconhecer as diferenças biológicas e evolutivas dos isolados de *G. duodenalis*, principalmente a especificidade a um determinado hospedeiro, e o facto de que o reconhecimento dos agrupamentos como espécies diferentes pode afetar o posicionamento das autoridades frente ao potencial zoonótico e a ameaça à saúde humana. O Quadro 3 apresenta a nova classificação proposta.

**Quadro 3:** Nova classificação de *Giardia* proposta por Monis *et al.* (2009)

Espécie	Hospedeiro
<i>G. duodenalis</i> (=agrupamento A)	Homem e outros primatas, cães, gatos, bovinos, roedores, outros mamíferos silvestres
<i>G. enterica</i> (=agrupamento B)	Homem e outros primatas, cães, e algumas espécies de mamíferos silvestres
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. canis</i> (=agrupamento C e D)	Cães, outros canídeos
<i>G. cati</i> (=agrupamento F)	Gatos
<i>G. bovis</i> (=agrupamento E)	Bovinos, ovinos, suínos
<i>G. simondi</i> (=agrupamento G)	Ratos
Fonte: MONIS <i>et al.</i> , 2009 (adaptado)	

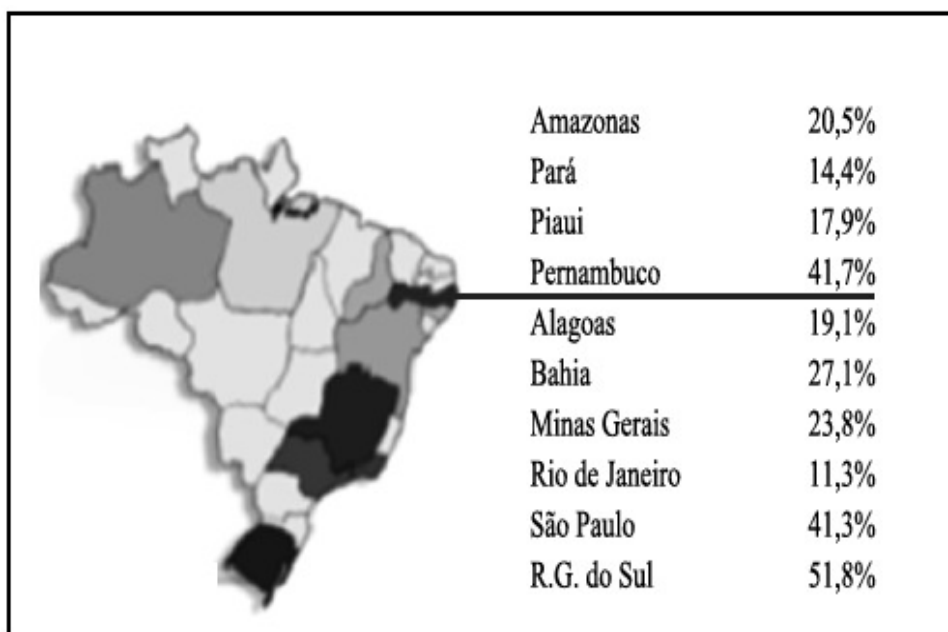
Esses autores esperam que a sua proposta seja discutida por outros grupos, originando um consenso e uma nova nomenclatura para os agrupamentos de *G. duodenalis*.

#### 4.2.5. Epidemiologia.

A espécie *G. duodenalis* apresenta distribuição global. Estima-se que cerca de 280 milhões de infecções anuais sejam causadas no homem por esse protozoário (Lane & Lloid, 2002). Trata-se do parasita intestinal humano mais comum em países desenvolvidos, sendo a incidência da giardíase, nos Estados Unidos, estimada em 2,5 milhões de casos por ano (Furness *et al.*, 2000). Na África, Ásia e América Latina cerca de 200 milhões de pessoas apresentam giardíase sintomática e há 500 mil casos novos notificados a cada ano (Who, 1996). É também um parasito frequentemente encontrado em animais domésticos como gado, cães e gatos; em várias espécies de mamíferos selvagens e em aves (Thompson, 2004).

No Brasil, como pode ser visualizado na figura (2), a giardíase apresenta grande variabilidade na prevalência entre as parasitoses gastrintestinais.





**Figura 2:** Prevalência de giardíase no Brasil, entre parasitoses gastrintestinais (Adaptado de Cimerman; Cimerman, 2003).

A prevalência de indivíduos com exame de fezes positivo para esse parasita é de 2 a 5% em países desenvolvidos e de 20 a 30% em países em desenvolvimento (Almeida *et al.*, 2006). Pesquisas recentes investigaram a presença desse protozoário em crianças de creches de diferentes cidades e estados do Brasil. Uchôa *et al.* (2001) realizaram um estudo coproparasitológico em 218 crianças que frequentavam creches comunitárias de Niterói (RJ) e em 43 funcionários. Nas crianças, o protozoário mais prevalente foi *G. duodenalis* com 38,3%. Guimarães e Sogayar (2002) realizaram um estudo para detectar anticorpos séricos anti-*G. duodenalis* em crianças de creches e estimar a frequência de infecção deste parasita em áreas endêmicas e de um total de 147 crianças, 93 (63,3%) apresentaram quistos de *Giardia* nas fezes. Carvalho *et al.* (2006) realizaram estudos de ocorrência de enteroparasitoses em quatro creches no município de Botucatu (SP) e dentre os parasitas *G. duodenalis* (26,8%) foi o que obteve maior frequência. Chaves *et al.* (2006) fizeram um levantamento de protozoonoses e verminoses em sete creches municipais de Uruguaiana (RS) e encontraram uma prevalência de 74,1% de giardíase. Mascarini e Donalísio (2006) realizaram dois estudos transversais com crianças em creches municipais de Botucatu (SP) e detectaram prevalência

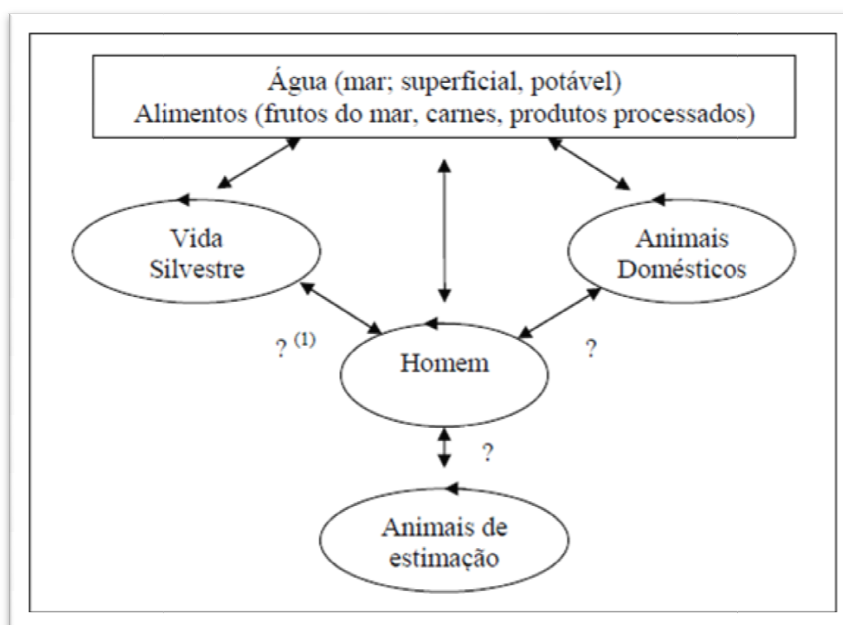
de giardíase de 23,7% em 2002 e 21,4% em 2003. Thales *et al.* (2008) comprovaram num estudo de prevalência de enteroparasitos em 176 crianças (1 a 5 anos), matriculadas em três creches públicas do município de Vespasiano (MG), uma prevalência de giardíase de 40%. Andrade *et al.* (2008) ao tentarem conhecer a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em crianças de 0 a 6 anos de idade, de um Centro de Educação Infantil Público de Blumenau (SC), entre Março e Maio de 2006, por meio de exames parasitológicos, verificaram uma maior prevalência de *G. duodenalis* com 18,9% e apenas 7,6% de *Cryptosporidium* spp. Barçante *et al.* (2008) estudaram a ocorrência de enteroparasitas em 176 crianças (1 a 5 anos), matriculadas em três creches públicas do município de Vespasiano (MG), e obtiveram um coeficiente de positividade de 22,7%. Das 40 crianças parasitadas, 7 (17,5%) estavam infectadas com mais de uma espécie de parasito. Quanto à distribuição total dos enteroparasitas na população parasitada, destacou-se a prevalência de: *Entamoeba coli* (57,5 %), *G. duodenalis* (40%), *Entamoeba histolytica/dispar* (15 %), *Trichuris trichiura* (7,5 %), *Ascaris lumbricoides* (7,5 %), *Enterobius vermicularis* (2,5 %), *Taenia* sp. (2,5 %) e *Hymenolepis* sp. (2,5 %). Zaiden *et al.* (2008) Estudou 276 crianças de creches de Rio Verde (GO), obtendo uma prevalência de 39,9%. O poliparasitismo ocorreu em 12 (4,4%) e o monoparasitismo em 98 (35,5%) das crianças. Os parasitas mais prevalentes foram *G. duodenalis* e *E. coli* 21,4% e 12,0% respectivamente. Os resultados da associação de *G. duodenalis*/*E. coli* foram mais prevalentes na C2 (5,5%) e C3 (4,6%). Por sua vez, Tashima *et al.* (2009) ao analisarem amostras de fezes de crianças que frequentavam determinada creche em Presidente Bernardes (SP), detectaram uma prevalência de giardíase de 16%. A análise das fezes dos familiares de tais crianças e dos funcionários da creche também foi realizada. Algumas mães e irmãos estavam parasitados por *G. duodenalis*. No entanto, como a técnica de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) foi empregada, foi possível concluir que as crianças provavelmente adquiriram essa parasitose durante o período de estada na creche, pelo contato pessoal entre elas, já que a maioria dos isolados dessas crianças foi enquadrado em um dentre os três grupos genéticos encontrados, e os isolados dos familiares nos outros dois grupos.

*Giardia* tem sido considerada um patógeno re-emergente devido ao seu crescente papel em surtos de diarreia em crianças que frequentam creches e pelas altas taxas de giardíase em animais como bezerros, cães e gatos. (Thompson, 2000)

Para Costa-Macedo e Rey (1996) a giardíase é também conhecida como a diarreia dos viajantes que entram em contacto com o agente etiológico quando em regiões endémicas. Também podem ser fontes de infecção, as babás e os manipuladores de alimentos crus como as mães, que preparam alimentos para os filhos sem levar em consideração regras básicas de higiene pessoal, atuando como fontes de infecção a partir do período de desmame e introdução de nova dieta.

Um estudo de caso direccionado à giardíase relata a importância da água como veículo do parasita (Nunez *et al.*, 2003). Nessa mesma linha de raciocínios, diversos autores alertam que a ingestão de água é de importância substancial para os seres vivos embora possa desencadear doenças gastrintestinais em níveis alarmantes por veicular, entre outros, quistos de *G. duodenalis*, chamando a atenção para a necessidade de tratamento da água potável e do esgoto para o que dele efluir não contamine a água dos rios e poços, tornando-os fonte de infecção (Semenas *et al.*, 1999; Paulino *et al.*, 2001; Heller *et al.*, 2004; Tashima e Simões, 2004; Traviezo *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004).

Os diferentes ciclos de transmissão de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. estão indicados na Figura (3), onde podem ser observadas muitas incertezas principalmente na interação entre os ciclos – parte zoonótica na transmissão desses protozoários ao homem.



**Figura 3** : Ciclos de transmissão de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. (Adaptado de Hunter e Thompson, 2005). <sup>(1)</sup> Os pontos de interrogação indicam incertezas na interação.

Em relação à transmissão hídrica de *Giardia*, está confirmado que o consumo de água não tratada ou de água contaminada com esgoto favorece a infecção por este parasita (Hoque *et al.*, 2002b; Jakubowski & Graun, 2002) e que a maioria das epidemias de giardíase em humanos tiveram relação com contaminação de lençóis freáticos (Jakubowski & Graun, 2002). Além disto, a irrigação de vegetais (que habitualmente são ingeridos crus) com água não tratada ou contaminada com quistos de *Giardia* também é um fator de risco (Thurston-Enriquez *et al.*, 2002). A contaminação do ambiente, incluindo a água, pode ser resultante da ação do homem, da agricultura e dos animais selvagens (Heitman *et al.*, 2002).

#### 4.2.6. Diagnóstico e Tratamento.

O método clássico para a detecção de *Giardia* em amostras de fezes é a microscopia, cuja sensibilidade foi estimada entre 50 e 70% (Burke, 1975). Uma vantagem dessa técnica é que permite a detecção simultânea de outros parasitas. No entanto, uma limitação para seu uso é o fato

de sua sensibilidade depender das habilidades do microscopista (Johnston *et al.*, 2003; Schuurman *et al.*, 2007).

Recentemente imunodiagnósticos (testes baseados na coloração com anticorpos fluorescentes e ensaios enzimáticos) mostraram ser uma possível alternativa para a microscopia, mas embora sensíveis, requerem muitos reagentes, procedimentos de lavagem e etapas de incubação (Mank *et al.*, 1997; Schuurman *et al.*, 2007).

O emprego da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção de *Giardia* tem sido fundamental, pois sua associação a outras técnicas, como Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) e o sequenciamento, possibilita a caracterização molecular dos isolados de amostras clínicas e ambientais (Thompson, 2004). Além disso, as técnicas moleculares são altamente sensíveis, específicas e de fácil interpretação (Mahbubani *et al.*, 1992; Mcglade *et al.*, 2003). Alguns marcadores moleculares utilizados em estudos de caracterização molecular de *Giardia* são o *SSU rRNA* e genes que codificam a produção de glutamato desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*), beta giardina ( $\beta$  *giardina*) e fator de elongação 1 $\alpha$  (*ef1 $\alpha$* ) (Shith *et al.*, 2006).

Os derivados nitroimidazólicos (metronidazol, ornidazol, tinidazol e nimorazol) são os medicamentos mais recomendados para a cura da giardíase. Estes medicamentos podem apresentar efeitos colaterais e são contra-indicados durante a gravidez. Outros fármacos que podem ser empregados no tratamento da giardíase são o albendazol, furazolidona e a quinacrina (Rey, 2008).

### **4.3. *Cryptosporidium* spp.: uma breve revisão.**

#### **4.3.1. Histórico.**

O parasita *Cryptosporidium* é um protozoário intracelular obrigatório que se desenvolve preferencialmente nas microvilosidades de células epiteliais do trato gastrointestinal, respiratório e

urinário podendo atingir uma variedade de hospedeiros, inclusive o homem. Esse protozoário tem sido responsável por um crescente número de surtos de doença gastrointestinal em todo mundo. (Ferreira & Borges, 2002; Carey *et al.*, 2004)

O gênero *Cryptosporidium* foi descoberto pelo parasitologista Ernest Edward Tyzzer em 1907, ao descrever a primeira espécie do gênero *C. muris*, um protozoário frequentemente encontrado nas glândulas de seus camundongos de laboratório (Tzipori; Widmer, 2008). Em 1912, o mesmo pesquisador apresentou uma segunda espécie, *Cryptosporidium parvum*, também encontrada em um camundongo, mas com o desenvolvimento no intestino delgado e com ooquistos menores que *C. muris* (Xiao *et al.*, 2004).

A descrição de uma nova espécie, *C. meleagridis*, em perus no ano de 1955 e a identificação de criptosporidiose em bovinos, no ano de 1971, forneceram os primeiros relatos de mortalidade e morbidade associados a infecções por *Cryptosporidium* spp. (Fayer, 2004). Nesta ocasião sua função patogênica não estava bem elucidada, hoje e dia sabe-se que essa é a terceira espécie mais comum identificada no homem (Slavim, 1955; Xiao *et al.*, 2004).

Desde sua primeira descrição, o *C. parvum* foi considerado por várias décadas um patógeno raro e oportunista. Em 1971 ele despertou o interesse veterinário após ser identificado como agente associado a surtos de diarreia em bezerros. Desde então, inúmeros casos em diferentes animais estão sendo identificados e novas espécies e genótipos têm sido descobertos e descritos tanto no homem como em diversos animais (Current & Garcia, 1991; Fayer *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2004)

A criptosporidiose foi verificada em humanos apenas em 1976, quando se tornou comum em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (Aids), também ocorrendo com maior frequência em outros indivíduos imonocomprometidos, como por exemplo, pacientes transplantados e pacientes recebendo quimioterapia para câncer (Cimerman, 2004; Fayer *et al.*, 2000; Hunter; Thompson, 2005).

Acreditava-se que a criptosporidiose ocorresse somente em indivíduos com algum tipo de imunodepressão, contudo nos últimos anos estudos demonstram que a doença é relativamente

frequente em indivíduos imunocompetentes. Assim como ocorre com outras doenças diarreicas, as infecções causadas por *Cryptosporidium* podem ser auto-limitadas e com sintomas brandos. Esta característica desfavorece a busca por atendimento médico e conseqüentemente leva a ausência de diagnóstico, gerando subnotificação da doença e falta de informação quanto à ocorrência de surtos (Peng *et al.*, 2003).

#### **4.3.2. Morfologia.**

O *Cryptosporidium* se desenvolve, preferencialmente, nas microvilosidades de células epiteliais do trato gastrointestinal, mas pode se localizar em outras partes, como parênquima pulmonar, vesícula biliar, ductos pancreáticos, esôfago e faringe. Ele parasita a parte externa do citoplasma da célula e dá a impressão de localizar-se fora dela; esta localização é designada, por vários autores, como intracelular extracitoplasmática. O parasita apresenta diferentes formas estruturais que podem ser encontradas nos tecidos (formas endógenas), nas fezes e no meio ambiente (ooquistos). Os ooquistos do *Cryptosporidium* são pequenos, esféricos ou ovóides (cerca de 5,0 x 4,5 µm para *C. parvum*, e 7,4 x 5,6 para *C. muris*), e contêm quatro esporozoítos livres no seu interior quando eliminados nas fezes (Neves, 2005).

#### **4.3.3. Ciclo de vida, Transmissão e Sintomatologia.**

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp. é mais complexo se comparado com a *Giardia* sp., pois possui estágios de reprodução assexuada e sexuada para se ter a formação do ooquisto, como pode ser visualizados na figura (4).





Pode-se citar cinco fatores importantes na disseminação do *Cryptosporidium*: (i) a resistência do ooquisto ao cloro e ácidos; (ii) seu pequeno tamanho; (iii) sua baixa dose de infecção; (iv) sua natureza esporulada infecciosa logo após eliminação e (v) seu potencial zoonótico (com exceção de *C. hominis*) (Dillingham *et al.*, 2002).

A criptosporidiose pode ser transmitida de um hospedeiro infectado, eliminando ooquistos nas fezes, para um hospedeiro suscetível por via fecal-oral, através do contato pessoa-a-pessoa ou animal-pessoa. Um dos principais modos de transmissão é a transmissão pessoa-a-pessoa (Roy *et al.*, 2004), que ocorre com mais frequência entre crianças com menos de cinco anos de idade, muitas vezes provocando surtos em creches. Profissionais e doentes de hospitais também constituem grupos de risco para aquisição da infecção (Sodré & Franco, 2001). A transmissão interpessoal possivelmente inclui as atividades sexuais sendo esse o principal modo de transmissão entre os indivíduos com Aids (Fayer *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000; Sodré & Franco, 2001).

Na década de 90, o parasita emergiu como um importante agente de surtos de veiculação hídrica, particularmente nos Estados Unidos e Reino Unido, desde então, muitos casos têm sido relatados tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Deste modo, estudos epidemiológicos sugerem que a contaminação dos recursos hídricos com ooquistos representa um importante fator para o desenvolvimento e transmissão da criptosporidiose (Fayer, 2004; Fayer *et al.*, 2005; Dawson, 2005).

Como surtos de criptosporidiose humana podem ter como origem água de bebida e destinada a lazer, animais domésticos e silvestres, sejam mamíferos ou aves, podem atuar como fontes de infecção deste parasito para o ser humano, por meio de contaminação de reservatórios de água (Dillingham *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 2004; Graczyk *et al.*, 2007).

Contudo, existem muitas dúvidas a respeito da epidemiologia da criptosporidiose, visto que os animais infectados são potenciais fontes de transmissão e disseminação no ambiente e que o agente possui baixa especificidade hospedeira tornando difícil estabelecer realmente os elos da cadeia de transmissão da doença. (Tzipori, 2002; Fayer, 2004)

Ainda existem poucos relatos na literatura sobre a veiculação através de alimentos, mas já foi observada a ocorrência de um surto de criptosporidiose pela ingestão de suco de maçã, e ainda relatos de criptosporidiose adquirida pela ingestão de leite cru, salada de frango, cebola crua, salsicha crua, miúdos de carne bovina e vegetais crus (Fayer *et al.*, 2000; Slifko *et al.*, 2000; Sodré & Franco, 2001; Dillingham *et al.*, 2002) e ostra, mariscos e mexilhões (Slifko *et al.*, 2000; Fayer *et al.*, 2004).

Finalmente, apesar dos sintomas pulmonares frequentes em indivíduos imunocomprometidos com criptosporidiose e a aparente aquisição respiratória de espécies que afetam as aves, a transmissão aerógena para o homem ainda não está bem documentada (Fayer *et al.*, 2000; Dillingham *et al.*, 2002). Entretanto, Ramirez *et al.* (2004) relatam a transmissão de *Cryptosporidium* por aerossóis.

Alguns grupos de insetos, como as baratas, moscas domésticas e alguns tipos de besouros, e rotíferos aquáticos, já foram incriminados como vetores mecânicos de *Cryptosporidium*. A barata *Periplaneta americana* foi encontrada contendo ooquistos no trato intestinal e a mosca doméstica com ooquistos nas fezes e na superfície do corpo (Fayer *et al.*, 2000). Nos Estados Unidos, moscas sinantrópicas silvestres das famílias Muscidae, Calliphoridae, Lauxaniidae e Anthomyiidae foram encontradas naturalmente infectadas com ooquistos viáveis de *C. parvum*, sendo 25,9% infectadas com ooquistos viáveis no intestino e 14,2% no exoesqueleto (Grackzyk *et al.*, 2003). Essas espécies de moscas não picam, mas podem ser vetoras mecânicas dos ooquistos, contaminando alimentos. Dessa forma, casos isolados ou mesmo surtos de criptosporidiose por ingestão de alimentos poderiam ser causados por essas moscas (Dillingham *et al.*, 2002)

As infecções por *Cryptosporidium* spp. podem ser assintomáticas, ou, até mesmo, enterites severas de difícil controle. Após um período de incubação de sete a dez dias, cerca de 90% dos indivíduos acometidos podem apresentar até 20 episódios diários de diarreias líquida. A perda hídrica é avaliada em três litros por dia, podendo atingir até 17 L/dia (Navin & Juranek 1984, Fayer

e Ungar 1986, Ungar 1995). Outros sintomas são: febre, vômitos, cólica e perda de peso. (Dupont *et al.*, 1995; Cimerman; Cimerman, 2004;)

A susceptibilidade do hospedeiro humano à infecção ou doença depende de uma série de fatores que predisõem, ou protegem, um indivíduo exposto da multiplicação do parasita. Dois fatores bem documentados são idade e o estado imunológico. Estes fatores também dependem de outros parâmetros os quais são provavelmente mais difíceis de se caracterizar. Mais além, infecção e doença estão intimamente relacionadas, porém, devem ser vistas como situações distintas uma vez que a excreção de ooquistos pode ocorrer no homem sem nenhum sintoma da doença (da Silva *et al.*, 2003), e ainda isolados de *Cryptosporidium* dados em doses iguais a indivíduos normais variam em seu poder de causar diarreia. (Teunis *et al.*, 2002)

O sintoma mais comum da doença, tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunocomprometidos, é a diarreia aquosa e abundante, com coloração esverdeada ou incolor, sem muco ou sangue. Outros sintomas que podem ocorrer são cólicas abdominais, náusea, vômitos, dor de cabeça, febre baixa ( $< 39^{\circ}\text{C}$ ), dores musculares, indisposição, fraqueza, fadiga, anorexia, perda de peso e uma variedade de problemas respiratórios (Ramirez *et al.*, 2004). Nos pacientes com Aids pode ocorrer ainda a criptosporidiose respiratória, com tosse persistente e dispnéia (Jensen *et al.*, 1990; Brea Hernando *et al.*, 1993; Sodré & Franco, 2001).

A criptosporidiose acomete mais severamente os indivíduos com sistema imune comprometido, embora não haja dados indicando que os mesmos sejam mais suscetíveis à infecção do que os indivíduos imunocompetentes (Butler & Mayfield, 1996). A severidade da infecção em portadores do vírus HIV é proporcional ao grau de imunodeficiência, ou seja, quando a contagem de linfócitos CD4 está acima de  $180 \text{ células/mm}^3$ , a diarreia geralmente é auto-limitada, e quando os indivíduos apresentam a contagem de CD4 abaixo de  $140 \text{ células/mm}^3$ , tendem a apresentar a forma persistente da doença (Brantley *et al.*, 2003; Leav *et al.*, 2003)

#### 4.3.4. Taxonomia.

A taxonomia do género, baseada em aspectos morfológicos, é de difícil realização devido ao reduzido tamanho dos ooquistos e também devido à perda de suas características morfológicas, principalmente em amostras ambientais. Essa limitação estimulou a aplicação de métodos moleculares na identificação das espécies destes microrganismos. Taxonomicamente, esse parasita pertence ao Phylum Apicomplexa; Classe Sporozoa; Sub-classe Coccidiasina; Ordem Eucoccidioridia; Sub-ordem Eimeriorina; Família Cryptosporidiidae e Género *Cryptosporidium* (Fayer, 2004). O *C. parvum* apresenta um enorme potencial reprodutivo o que resulta em organismos geneticamente semelhantes, tornando sua taxonomia confusa e difícil. Nos últimos anos a caracterização molecular tem ajudado a validar várias espécies dentro do género *Cryptosporidium* evitando assim uma classificação errônea (Xiao *et al.*, 2004).

*C. hominis* e *C. parvum* são as espécies patogénicas frequentemente encontradas no homem, no entanto casos de infecções humanas por *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris* e *C. suis*, além de alguns genótipos de *C. parvum* têm sido relatado na literatura atual (Katsumata *et al.*, 2002; Cama *et al.*, 2003; Gibbons-Matthews e Prescott, 2003; Kassa *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2005; Hashimoto *et al.*, 2006)

São reconhecidas 19 espécies de *Cryptosporidium* as quais foram confirmadas por dados moleculares, morfológicos e biológicos, como apresentado no Quadro 4. Segundo Carvalho (2009) falta uma uniformidade na nomenclatura usada pelos pesquisadores.

**Quadro 4:** Espécies e principais hospedeiros de *Cryptosporidium*.

Espécies	Principais Hospedeiros
<i>C. muris</i>	Roedores
<i>C. parvum</i>	Gado, animais domésticos, homem.
<i>C. meleagridis</i>	Aves e homem
<i>C. wrairi</i>	Porcos da Guiné
<i>C. felis</i>	Gatos
<i>C. serpentis</i>	Cobras
<i>C. baileyi</i>	Aves domésticas
<i>C. galli</i>	Aves
<i>C. andersoni</i>	Gado
<i>C. canis</i>	Cães
<i>C. molnari</i>	Peixes
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes
<i>C. varanii</i>	Lagartos
<i>C. bovis</i>	Gado
<i>C. ryanae</i>	Gado
<i>C. fayeri</i>	Canguru
<i>C. macropodum</i>	Canguru
<i>C. hominis</i>	Homem
<i>C. suis</i>	Porcos

Fonte: Carvalho, 2009; Fayer, 2010.

Barta & Thompson (2006) alertam para a necessidade de reavaliar as espécies de *Cryptosporidium* dentro do filo dos Apicomplexas. Há evidências de que o parasita deve ser colocado em um grupo taxonômico próximo das *Gregarines* (parasitas de invertebrados). Aspectos como, infecção restrita a região apical de células epiteliais, tamanho dos ooquistos, insensibilidade a agentes "anti-coccidias", bem como, reações cruzadas como anticorpos de *Cryptosporidium* e *Gregarinas* revelam seu comportamento atípico em relação à classe dos coccídeos.

#### 4.3.5. Epidemiologia.

A criptosporidíase é encontrada em todos os continentes, esta infecção ocorre com prevalência de 0,6 a 20% em populações selecionadas de países desenvolvidos, e 4 a 32% em países em desenvolvimento. Nos EUA, 3 a 4% dos pacientes com Aids apresentam enterite por *Cryptosporidium*, sendo a incidência maior entre os aidéticos homossexuais. No Haiti e na África, metade dos aidéticos tem criptosporidiose (Rey, 2008). Embora a prevalência de criptosporidiose em pacientes com Aids tenha diminuído substancialmente com a introdução de terapias

antiretrovirais (Lê Moing *et al.*, 1998), o parasita ainda representa um grande problema de saúde pública, pelo seu alto potencial oportunista e frequente envolvimento em surtos de diarreia em indivíduos imunocompetentes, tendo a água como principal via de transmissão (Shith; Rose, 1998).

Lima e Stamford (2003) citam que no Brasil foram detectados 2.842 casos da doença no período de 1980 a 1997 entre os pacientes imunodeprimidos, particularmente, aqueles portadores de Aids, sendo que as regiões Nordeste e Sudeste são as mais afectadas do país. Os autores chamam a atenção para o facto de que nem todos os indivíduos infectados apresentam sintomas, mas eliminam ooquistos, facto de grande importância para a saúde pública. Ferreira e Borges (2002) publicaram uma revisão sobre as infecções que afectam os indivíduos imunocomprometidos, submetidos a transplante de rins, medula óssea, fígado, coração, etc, e, principalmente os indivíduos com Aids e nomearam o *C. parvum* como o segundo protozoário que causa mais infecções oportunistas nesses pacientes.

Estudos realizados em diferentes estados no Brasil têm demonstrado uma prevalência de *Cryptosporidium* spp. entre 1,8% a 32% em crianças de 0 a 12 anos de idade (Nascimento *et al.*, 2009; Mascarini & Donalisio, 2006; Gennari-Cardoso *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 2001). Pesquisas realizadas em mais de 100 regiões geográficas de, pelo menos, 40 países, em indivíduos portadores ou não de diarreia, indicam que as regiões mais desenvolvidas apresentam uma prevalência média de 1% a 3% e que nas menos desenvolvidas os índices variam de 10% a 31% (Mbiko *et al.* 1998; Núñez *et al.*, 2003; Neves, 2005; James *et al.* 2003).

A prevalência da doença é variável e depende de muitos fatores que interferem na sua ocorrência, destacando-se entre eles a idade, os hábitos e os costumes das populações, a época do ano, a área geográfica, a densidade populacional, o estado nutricional da população e o estado de imunocompetência dos indivíduos (Neves, 2005).

#### 4.3.6. Diagnóstico e Tratamento.

Em pacientes imunocompetentes, a doença habitualmente não necessita de tratamento, obtendo a maioria dos pacientes cura espontânea. Reidratação oral ou parenteral é por vezes necessária em pacientes mais gravemente acometidos. Já em indivíduos imunodeprimidos, particularmente os portadores de Aids, além da reidratação pode ser necessário o uso de antidiarréicos, tais como difenoxilato ou leperamida, que muito embora não diminuam a perda hídrica pelas fezes diminuem o número de evacuações, melhorando desta forma a qualidade de vida desses pacientes. O acetato de octreotida, um análogo da somatostatina, inibe a secreção intestinal de líquidos e tem se mostrado útil em melhorar a diarreia desses pacientes, sem entretanto levar à cura parasitológica (Cimerman, 2008).

São inúmeros os trabalhos que destacam a importância de *C. parvum* como agente causal de diarreia severa e prolongada, causando morbidade e mortalidade em crianças mal nutridas e nos indivíduos com imunodeficiência. No entanto, a frequência desta protozoose entre crianças normais no Brasil ainda é pouco conhecida (Cimerman *et al.* 1999). Este facto está relacionado, principalmente, com a dificuldade de detecção desses parasitas pelos métodos de exame parasitológico de fezes rotineiramente empregados devido às dimensões muito pequenas desses protozoários. Os métodos especiais de coloração que permitem sua visualização e identificação nem sempre são solicitados pelo clínico diante de um caso de diarreia em crianças consideradas normais, deixando assim sem diagnóstico possíveis casos de infecção por *C. parvum* (Sodré e Franco, 2001). A microscopia continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico de parasitas, embora vários problemas estejam associados a esta técnica como método diagnóstico. alguns parasitas, como *Cryptosporidium*, são semelhantes, muito pequenos, difíceis de corar e de serem detectados (Rimhanen-Finne *et al.*, 2001). O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose é feito pela demonstração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes, após métodos de concentração baseados em princípios de flutuação ou centrifugo sedimentação. Após concentração, para permitir

a visualização dos oocistos, são utilizadas técnicas de coloração especiais, como: Ziehl-Neelsen, Kinyoun, coloração negativa, coloração a quente de safranina-azul de metileno, coloração modificada de Kohn, coloração modificada de Koster, auramina, entre outras (Martinez e Belda, 2001). Porém, os oocistos de *Cryptosporidium* estão entre os menores estágios exógenos dos apicomplexos e algumas diferenças morfológicas não são visíveis na microscopia óptica (Morgan et al., 1999). O factor limitante das técnicas convencionais é que nenhuma é específica para o *C. parvum*, sendo ainda que todos os métodos citados requerem uma grande quantidade de oocistos para sua detecção positiva (Sturbaum et al., 2001). Portanto, métodos moleculares mais sensíveis, como a PCR são requeridos para detecção de pequeno número de oocistos (<10.000) (da Silva et al., 1999). A biologia molecular pode fornecer aos epidemiologistas informações muito além das oferecidas pela microscopia tradicional, pela cultura e imunologia, auxiliando na vigilância de agentes infecciosos e na determinação das fontes de infecção (Morgan 2000). Várias técnicas moleculares são empregadas para estudos de *Cryptosporidium*, sendo elas: Hibridização de sondas de DNA, PCR (Polymerase Chain Reaction), PCR Multiplex, nested-PCR, Real Time PCR, PCR e Hibridização, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Microsatélites e Heteroduplex.

*Cryptosporidium* é um dos poucos protozoários entéricos contra o qual ainda não se descobriu uma terapia efetiva. A falta de um fármaco específico reflete a singularidade desse parasita que inclui a sua localização intracelular e suas afinidades filogenéticas (Thompson & Chalmers, 2002). Perto de uma centena de fármacos foram testados para o tratamento desta doença, entre elas: azitromicina, paramomicina, metronidazol, letrazuril, nitazoxanida; sem apresentar sucesso na erradicação (Cimerman; Cimerman, 2004). Estudos recentes têm demonstrado que a nitazoxanida possui eficácia comprovada no tratamento da criptosporidiose em crianças e adultos imunocompetentes. Estudos preliminares mostraram que o fármaco poderia também ser utilizado



para o tratamento de pacientes com Aids e criptosporidiose. A nitazoxanida é o primeiro fármaco a ser liberado para o tratamento da criptosporidiose nos EUA (Neves, 2005).

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL E DA POPULAÇÃO EM ESTUDO.**

O estudo foi realizado na creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na Comunidade “Entra A Pulso”, situada em um bairro nobre (Boa Viagem) da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil.

Recife, capital do Estado de Pernambuco, situa-se no litoral nordestino e ocupa uma posição central, a 800Km das outras duas metrópoles regionais, Salvador e Fortaleza, disputando com elas o espaço estratégico de influência na Região. Encontra-se nas coordenadas geográficas: latitude 8° 04' 03" S e longitude 34° 55' 00" W. Possui 1.422.905 habitantes (2000), 219.493 km<sup>2</sup> de área territorial, clima quente e húmido e uma temperatura média de 25,2°C. Está dividida em 6 Regiões Político-Administrativas (RPA) com 94 bairros: RPA 1 (Centro: 11 bairros), RPA 2 (Norte: 18 bairros), RPA 3 (Noroeste: 29 bairros), RPA 4 (Oeste: 12 bairros), RPA 5 (Sudoeste: 16 bairros) e RPA 6 (Sul: 8 bairros). O município do Recife reconhece a existência de 66 Zonas Especiais de Interesse Social (ZEIS), disseminadas pelo espaço urbano. Devido à existência de perto de 490 favelas, representando 15% da área total do município e 25% da área ocupada, as ZEIS agregam cerca de 80% delas (<http://www.recife.pe.gov.br>).

Boa Viagem está localizado na RPA 6, possui 738.1 hectares de área territorial e 100.388 habitantes, é considerado atualmente como o bairro mais populoso de Recife, seguido por COHAB (69.134 hab) e Várzea (64.512 hab). Este bairro possui 6 Zonas Especiais de Interesse Social e Áreas Pobres: Entra A Pulso, Borborema, Ilha do Destino, Rosa Selvagem, Sítio Wanderley, Vila Arraes e Sítio Cardoso (<http://www.recife.pe.gov.br>).

A Comunidade do “Entra A Pulso”, nome dado pela sua resistência fundiária, possui uma área de 8.3 hectares com aproximadamente 10.000 habitantes segundo dados estatísticos do censo do IBGE (2000) e com 1.912 casas cadastradas na URB (Empresa de Urbanização do Recife). Esta comunidade possui nas suas proximidades escolas da rede pública estadual, municipal com Ensino Fundamental e Médio, atendendo a população da comunidade e entorno. A população da comunidade sobrevive do trabalho informal, ambulantes na orla da praia, domésticas, lavadeiras, pedreiros, comerciantes entre outras profissões (<http://www.recife.pe.gov.br>).

A creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem, está situada no centro da comunidade “Entra A Pulso”. Actualmente a creche atende 92 crianças compreendidas na faixa etária de 0 a 6 anos, de ambos os sexos, residentes da comunidade. Possui 19 funcionários, residentes da comunidade, que trabalham em tempo integral (manhã-tarde) de segunda-feira à sexta-feira. Em relação à distribuição e organização das crianças na creche foram criados grupos separados pela idade, sendo eles: Berçário (0-1 anos), G1 (2 anos), G2 (3 anos), G3 (4 anos), G4 (5 anos) e G5 (6 anos). Os funcionários que trabalham na cozinha ocasionalmente cuidam das crianças e são orientados pela directora da creche quanto aos cuidados a serem tomados quanto à higiene comunitária entre uma criança e outra. A água que serve a creche é encanada e há utilização de água filtrada para ingestão das crianças e dos funcionários. O destino das fezes se dá pela utilização de fossa. O lixo produzido pela creche é removido três vezes por semana. A lavagem da caixa de água é realizada anualmente e a mesma encontra-se devidamente tapada. A creche possui parque de recreação, que é coberto por areia que nunca foi trocada, que contém diversos brinquedos (escorregador, gira-gira, etc.), cozinha, refeitório, sala de brinquedos comunitária, casas de banho comunitárias e sala para atendimento médico, além de espaços reservados à administração. A creche não possui horta e as refeições são produzidas pela própria creche, com o mesmo cardápio fornecido pela nutricionista da Secretaria da Educação para as demais creches.

## **5.2. AMOSTRAS DE FEZES COLHIDAS E ANALISADAS.**

Foram colhidas e analisadas 94 amostras de fezes de adultos e crianças com idade de 0 (zero) a 15 (quinze) anos de idade, de ambos os sexos, provenientes da creche e comunidade em estudo. Foram colhidas amostras durante três dias alternados, em potes colectores de plástico, sem conservante.

## **5.3. COLHEITA DE DADOS.**

Para cada indivíduo foi aplicado um pequeno questionário (Anexo 8.7) no qual constou uma ficha de identificação com dados gerais como Registro Geral (RG), nome, sexo, data de nascimento e nome do responsável (se menor de 18 anos). A ficha continha, mais, algumas perguntas sobre sintomatologias recentes como febre, diarreia, dor abdominal e vômitos e sobre dados epidemiológicos (se possuía animais de estimação, infra-estrutura de saneamento básico da residência e hábitos alimentares e higiênicos).

As colheitas de fezes e exames coproparasitológicos de amostras seriadas foram feitas em datas previamente marcadas. As amostras foram colhidas pelos próprios voluntários e/ou responsáveis em seus domicílios, que receberam recipientes assépticos após serem previamente instruídos sobre como fazer adequadamente a recolha da amostra de fezes (Anexo 8.9) de modo a evitar ao máximo, contaminação do material.

## **5.4. CONTROLO DE QUALIDADE.**

Neste estudo procurou-se padronizar a metodologia de colheita e processamento das amostras. Para isso, partiu-se inicialmente da orientação de colheita ao voluntário e/ou responsável,

até à conservação e processamento das amostras de fezes. Outro cuidado foi o fornecimento de recipientes assépticos, próprios para colheita de fezes e a realização do questionário investigativo.

## **5.5. ANÁLISE EM LABORATÓRIO.**

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para realização de exames coproparasitológicos, onde foram utilizadas duas técnicas: a) Método Directo, utilizando para visualização microscópica o corante Lugol, de acordo com a descrição de Huggins *et al.* (1985); b) Método de Ritchie Modificado, utilizando para visualização microscópica o corante Ziehl-Neelsen para pesquisa de *Cryptosporidium*.

As amostras positivas e negativas foram encaminhadas para a U.E.I. de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), para detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. através de técnicas de biologia molecular (*nested*-PCR/sequenciação de DNA).

### **5.5.1. CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS PELO MÉTODO DE SEDIMENTAÇÃO DIFÁSICA DE RITCHIE MODIFICADO (adaptado de Casemore *et al.*, 1985).**

Num tubo de centrífuga de 10mL, devidamente identificado, colocou-se 3,0mL de água destilada, 0,5mL (ou o equivalente) de fezes e 2,0mL de éter dietílico (solubiliza os lípidos). Agitou-se vigorosamente o tubo no vórtex e transferiu-se o seu conteúdo para um novo tubo de centrífuga, filtrando-o através de uma gaze dobrada sobre um funil, para eliminar os detritos fecais de maiores dimensões. Perfez-se o volume do tubo com água destilada e procedeu-se a uma primeira centrifugação, durante 5 minutos a uma velocidade de 1500 rpm. No passo seguinte, desprezou-se o anel de gordura à superfície, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de

centrífuga e conservou-se o sedimento obtido. Perfez-se o volume do último tubo, com água destilada e efectuou-se a segunda centrifugação, durante 10 minutos a uma velocidade de 4500 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e conservou-se o segundo sedimento. Juntamente os sedimentos resultantes das duas centrifugações num eppendorf de 1,5 mL e armazenou-se a 4°C.

### **5.5.2. COLORAÇÃO COM SOLUÇÃO DE LUGOL – IDENTIFICAÇÃO DE QUISTOS DE *Giardia* sp. E DE OUTROS PROTOZOÁRIOS E OVOS DE HELMINTAS EM AMOSTRAS DE FEZES A FRESCO.**

Os quistos e, ocasionalmente, os trofozoítos de *Giardia* sp. são detectados em amostras de fezes por microscopia óptica, que continua a ser o melhor método para o diagnóstico da giardiose (Cook *et al.*, 2002).

Colocou-se uma gota do sedimento total numa lâmina. De seguida, adicionou-se uma gota de solução de Lugol. Homogeneizou-se com o auxílio de uma lamela. Cobriu-se a preparação com a referida lamela e removeu-se o excesso com papel de filtro. Por fim, observou-se ao microscópio óptico composto. As lâminas foram observadas ao microscópio com uma objectiva de 40x sendo a presença de quistos e trofozoítos confirmada com a objectiva de imersão.

### **5.5.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.**

#### **5.5.3.1. EXTRAÇÃO DO DNA.**

Para a extração do DNA dos quistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi utilizado o método Mini-BeadBeater/Sílica (adaptado de Boom *et al.*, 1990 e Patel *et al.*, 1998). Este método baseia-se na presença de concentrações elevadas de agentes caotrópicos como Guanidina Tiocianato (GuSCN – provou ser um agente poderoso na purificação e detecção quer de DNA ou RNA, devido ao seu potencial na lise celular combinada com a inactivação das nucleases),

os ácidos nucleicos deverão se ligar à sílica (Boom *et al.*, 1990 ). Este método baseia-se no seguinte protocolo:

#### **A) Lise dos quistos/oocistos**

1. A 200µL de suspensão de oocistos concentrados adicionar 0,3g de partículas de zircónio com 0,5mm de diâmetro, 900µL de tampão de lise (tiocianato de guanidina 7M; Tris-HCl 50mM pH 6,4; EDTA 25mM pH 8,0; Trinton X-100 1,5% v/v) e 60µL de álcool isoamílico;
2. Agitar à velocidade máxima, durante 2,5 minutos num aparelho Mini-BeadBeater;
3. Centrifugar à velocidade máxima (14.000 rpm), durante 15 segundos, para a sedimentação dos detritos fecais insolúveis e das partículas de zircónio;
4. Transferir o sobrenadante para um tubo “eppendorf” limpo.

#### **B) Adsorção do DNA**

1. Adicionar ao sobrenadante, 25µL de uma suspensão aquosa de sílica em pó (1% pH 2,0; Sigma);
2. Agitar vigorosamente e incubar à temperatura ambiente, sob agitação constante, durante 30 minutos;
3. Centrifugou à velocidade máxima, durante 15 segundos, para que a sílica com o DNA adsorvido sedimente;
4. Desprezou o sobrenadante, vertendo diretamente o “eppendorf”.

#### **C) Lavagem**

1. Lavar duas vezes com 200µL de tampão de lavagem (tiocianato de guanidina 7M, Tris-HCl 50mM pH 6,4);
2. Lavar uma vez com 200µL de etanol a 80%;

3. Lavar uma vez com 200µL de acetona absoluta;
4. Desprezar a acetona e incubar a 55°C, até à evaporação completa do solvente.

#### **D) Eluição do DNA**

1. Ressuspender a sílica em 50µL de água destilada estéril;
2. Incubar a 55°C, durante 5 minutos, para facilitar a eluição do DNA;
3. Sedimentar a sílica por centrifugação, à velocidade máxima (14.000 rpm), durante 2 minutos;
4. Recolher o sobrenadante com DNA dissolvido para um tubo “eppendorf” limpo;
5. Guardar a amostra a -20°C, que será usada posteriormente para a PCR.

### **5.5.4. REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).**

#### **5.5.4.1. Amplificação por *nested*-PCR do gene $\beta$ -giardina.**

A vantagem de utilizar genes que codificam a giardina como alvo de detecção molecular de quistos de *Giardia*, é que estes são considerados exclusivos deste parasita (Cacció *et al.*, 2002). A utilização de um sistema de tipagem baseado na análise da sequência de um único *locus*, como a  $\beta$ -giardina, com elevada heterogeneidade sequencial, possibilita uma resolução tão alta como a tipagem de sequências multilocus (Lalle *et al.*, 2005).

A PCR é um método muito eficaz na amplificação de sequências específicas a partir de uma mistura complexa de DNA. Permite, por exemplo, a amplificação de apenas um *locus* do genoma completo de um organismo e em pouco tempo, a partir de apenas uma cadeia molde, é possível obter mais de um bilião de cópias. No entanto, a capacidade de amplificar mais de um bilião de cópias também aumenta a possibilidade de amplificação de uma sequência não pretendida de DNA, mais de um bilião de vezes. A especificidade da PCR é determinada pela especificidade dos *primers*



utilizados na reacção. Se os *primers* se ligarem a mais do que um *locus*, no produto de PCR, aparecerão amplicões de diferentes tamanhos. Para minimizar esta possibilidade e assegurar a especificidade, usam-se frequentemente dois pares de *primers*, em duas fases de amplificação – *nested*-PCR.

A designação *nested* deriva do facto de se utilizarem dois pares de *primers* na amplificação de um único *locus*: o primeiro par é usado na primeira fase desta técnica, que decorre como qualquer PCR de uma só fase; o segundo par (*nested primers*) liga-se aos fragmentos amplificados na primeira parte, resultando desta, amplicões de menor tamanho. A mais valia desta técnica, é que se ocorrer um erro e for amplificada uma sequência não pretendida, a probabilidade de tal voltar a acontecer, na segunda fase de amplificação, com o segundo par de *primers*, é muito baixa.

Os *primers* utilizados nas duas fases deste procedimento diferem no seu tamanho e sequência e encontram-se caracterizados no Quadro 5.

**Quadro 5** – Características dos *primers* usados nas duas etapas de *nested*-PCR.

Designação do <i>primer</i>	Sequência nucleotídica	Dimensão do amplicão (pb)	Referência
GIAFW1	5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGC-3'	753	Cacciò <i>et al.</i> , 2002
GIARV1	5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'		
GIAFW2	5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3'	511	Lalle <i>et al.</i> , 2005
GIARV2	5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'		

As reacções de PCR foram optimizadas em relação às descritas por Lalle *et al.* (2005), através de ajustes na concentração de cloreto de magnésio e na quantidade de DNA utilizada. A preparação das misturas reaccionais, decorre numa câmara de segurança biológica, com material antecipadamente esterelizado com radiação UV e mantendo sempre os tubos no gelo.

O procedimento de amplificação  $\beta$ -giardina foi efectuado num volume de 50  $\mu$ l, contendo a mistura reaccional da primeira PCR, 5  $\mu$ l de 10 $\times$  tampão de reacção (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM

Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 10 pmol de cada oligonucleótido iniciador (MWG Biotech), 0,02 mg de albumina do soro bovino ou BSA (sigla anglosaxónica para “bovine serum albumin”) (Sigma-Aldrich), 1,5 U de Biotaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase (Bioline), entre 5 a 10 µl de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. A segunda PCR foi realizada com 3 µl do DNA amplificado na primeira reacção, sendo a mistura reaccional igual à primeira.

Para cada uma das reacções, foi preparado um tubo de controlo negativo, no qual o DNA da amostra foi substituído por água esterilizada, com vista à detecção de contaminações e um tubo de controlo positivo, em que a amostra foi substituída por DNA da espécie a pesquisar, de forma a testar o termociclador e os componentes da mistura reaccional. Os tubos de PCR foram colocados no termociclador e submetidos às condições térmicas de amplificação referidas no Quadro 6, tendo o passo de desnaturação inicial de dez minutos a 95°C e o de extensão final de dez minutos a 72°C.

**Quadro 6** – Condições térmicas de amplificação por *nested*-PCR do gene da  $\beta$ -giardina.

Procedimento	Condições de amplificação		Nº de Ciclos
$\beta$ -giardina	Desnaturação	95°C, 45 seg.	35
	Ligação	49°C, 45 seg	
	Extensão	72°C, 60 seg	

Os produtos amplificados foram separados electroforeticamente em gel de agarose a 2%. As migrações electroforéticas decorreram a 80V durante 90 minutos, em tampão de corrida TAE 1x. o gel foi visualizado e fotografado (UV=246nm) sob luz ultravioleta, num transiluminador adequado (Vilbert Lourmat).

### 5.5.4.2. Amplificação por *nested*-PCR do gene SSU rRNA.

Para amplificação do fragmento da subunidade menor (SSU) do gene do rRNA ribossómico foi utilizada a técnica de *nested*-PCR com os seguintes *primers* caracterizados no Quadro 7.

**Quadro 7** – Características dos *primers* usados nas duas etapas de *nested*-PCR do gene SSU rRNA.

Designação do <i>primer</i>	Sequência nucleotídica	Dimensão do amplificação (pb)	Referência
CRY1	5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'	1325	Xiao <i>et al.</i> , 1999
CRY2	5'- CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA-3'		
CRY3	5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'	831 - 838	Xiao <i>et al.</i> , 1999
CRY4	5'- AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'		

O procedimento de amplificação SSU rRNA foi efectuado num volume de 50 µl, contendo a mistura reaccional da primeira PCR, 5 µl de 10× tampão de reacção (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 10 pmol de cada oligonucleótido iniciador (MWG Biotech), 0,02 mg de albumina do soro bovino ou BSA (sigla anglosaxónica para “bovine serum albumin”) (Sigma-Aldrich), 1,5 U de Biotaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase (Bioline), entre 5 a 10 µl de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. A segunda PCR foi realizada com 3 µl do DNA amplificado na primeira reacção, sendo a mistura reaccional igual à primeira, com excepção da BSA, que foi excluída. Em cada reacção de PCR foi incluído um tubo com uma amostra de DNA, em condições óptimas de qualidade e concentração, para funcionar como controlo positivo da mistura reaccional, e um controlo negativo, como indicador da inexistência de contaminação, por DNA exógeno, onde, no lugar do DNA, foi adicionada água desionizada estéril.

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador “T1 Thermocycler” (Biometra), tendo, em todas, o passo de desnaturação inicial sido de dez minutos a 95°C e o de

extensão final de dez minutos a 72°C. No Quadro 8 estão descritas as restantes condições de amplificação dos fragmentos do gene SSU rRNA.

**Quadro 8:** Condições de amplificação do DNA, para o gene SSU rRNA

Procedimento	Condições de amplificação		Nº de Ciclos
SSU rRNA	Desnaturação	95°C, 45 seg.	35
	Ligação	55°C, 45 seg	
	Extensão	72°C, 60 seg	

Os produtos amplificados foram separados electroforeticamente em gel de agarose a 2%. As migrações electroforéticas decorreram a 80V durante 90 minutos, em tampão de corrida TAE 1x. o gel foi visualizado e fotografado (UV=246nm) sob luz ultravioleta, num transiluminador adequado (Vilbert Lourmat).

#### 5.5.4.3. Purificação e sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR.

Os produtos de amplificação das PCR realizadas para submeter à técnica de sequenciação, foram purificados, através do protocolo comercial (JETQUICK PCR Product Purification Spin kit; Genomed), que permite a remoção rápida de impurezas e de contaminantes de produtos de PCR, após corrida electroforética em gel de agarose. No caso das *nested*-PCR, foram purificados os produtos da segunda reacção. De acordo com as instruções do fabricante, o referido protocolo consiste em quatro passos definidos:

**1) Solubilização da agarose:** cortam-se, cuidadosamente, as regiões do gel de agarose, correspondentes às bandas com as dimensões pretendidas, excluindo as moléculas de tamanho indesejado, o que permite, desde logo, a eliminação de dímeros de *primers* e de outros produtos inespecíficos. As porções de gel de agarose são colocadas em microtubos de 1,5 ml. De acordo com o fabricante, por cada 100 mg de gel, adicionam-se, proporcionalmente, 300 µl da solução L1. A

mistura vai a incubar a 50°C durante 30 minutos, agitando-se vigorosamente, em intervalos de 10 minutos. A solução L1 contém percloroeto de sódio, um agente que, quando utilizado em elevadas concentrações, remove complexos proteicos presentes em solução, acetato de sódio, cuja acção visa precipitar os ácidos nucleicos em solução, e Tris-Borato-EDTA (TBE), um tampão que, em conjunto com o aumento da temperatura, auxilia na solubilização da agarose.

**2) Adsorção:** a adsorção do DNA é realizada numa coluna específica (JETQUICK spin column; Genomed), que é colocada num tubo colector de 2 ml e para onde se transfere a mistura (aproximadamente 400 µl ). Esta coluna possui uma matriz de sílica que é um material com alta afinidade para as moléculas de DNA, carregadas negativamente. Centrifuga-se à velocidade máxima (23100 g), durante um minuto, sendo que no final se descarta o tubo com o filtrado.

**3) Lavagem:** esta etapa consiste na remoção de contaminantes, onde se volta a colocar a coluna num tubo colector de 2 ml, adicionando-se 500 µl de solução H2. A solução H2 é composta por EDTA, um forte agente quelante, aplicado para aprisionar iões monovalentes, Tris-HCl, um tampão que auxilia na manutenção do pH, funcionando como agente estabilizador da solução, etanol, que funciona como um forte solvente orgânico, e cloreto de sódio, utilizado para manter e estabilizar as cargas iónicas. Volta-se a centrifugar à velocidade máxima, durante um minuto. Despreza-se o filtrado, coloca-se novamente a coluna no tubo colector e promove-se nova centrifugação, igual à anterior, descartando-se, no final, o tubo com o filtrado. Esta segunda centrifugação tem por objectivo remover a totalidade do etanol, composto orgânico considerado como um contaminante limitante da reacção de sequenciação.

**4) Eluição do DNA:** coloca-se a coluna num microtubo de 1,5 ml e adicionam-se 50 µl de água desionizada estéril, pré-aquecida no aparelho Block Heater (Stuart Scientific) a 60°C. A água deve ser vertida no centro da matriz de sílica, de forma a ter uma distribuição uniforme e a solver o máximo de moléculas de DNA. Centrifuga-se à velocidade máxima, durante dois minutos e no final recupera-se o filtrado com o DNA purificado, conservando-o a -20°C. O controlo de qualidade da purificação é realizado através da técnica de electroforese em gel de agarose (1%).

Após a etapa de purificação, os produtos de PCR foram submetidos a sequenciação directa, no Laboratório de Sequenciação da Macrogen (Seuol, Coreia do Sul), num sequenciador automático (3730 XL DNA Analyser; Applied Biosystems) com tecnologia de electroforese capilar em gel de poliacrilamida. Triplicados de todas as sequências de DNA, foram determinadas em ambos os sentidos.

#### **5.5.4.4. Análise Bioinformática.**

A análise das sequências nucleotídicas consenso obtidas foi efectuada, recorrendo-se a programas de bioinformática específicos, como, o ChromasPro (versão 1.22, Technelysium Pty Ltd.), o BLAST (sigla do anglo-saxónico para *Basic Local Alignment Search Tool*) (versão 2.2) disponível no sítio do *National Centre for Biotechnology Information's* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e o CLUSTAL W2 (versão 2.0.12) disponível no sítio do *European Bioinformatics Institute* ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).

### **5.6. COLHEITA DOS DADOS ANTROPOMÉTRICOS.**

Para a colheita dos dados antropométricos, os pré-escolares e funcionários foram pesados com balança digital portátil, com capacidade para 136 Kg e sensibilidade de peso de 0,1Kg (Tanita®). As crianças foram pesadas, descalças e com o mínimo de roupa possível. Para a aferição da altura foi utilizado um estadiômetro fixo em parede plana em ângulo de 90° graus com o chão e com escala compreendida entre 0–220 cm (Seca®). Os pré-escolares e funcionários foram medidos em duas vezes, sem acessórios na cabeça, descalços e com o corpo alinhado à parede (Fagundes; Coutinho, 2004).

Nas crianças e adolescentes entre 2 a 19 anos foi feita a análise do Índice de Massa Corporal (IMC)/idade e sexo (CDC2000), sendo considerados abaixo do peso os abaixo do Percentil (P) 5,

peso normal entre P5-P85, excesso de peso entre P85-P95 e obeso  $\geq$  P95. No caso das crianças menores de 2 anos a análise foi realizada através das curvas de crescimento da Organização Mundial da Saúde (OMS) - 2006. Foram avaliados os parâmetros: peso x idade para análise do IMC, sendo considerados abaixo do peso os abaixo de P5, peso normal entre P5-P75, excesso de peso entre P75-P95 e obeso  $\geq$  P95. Entre os adultos, a análise do estado nutricional foi realizada por meio de análise do IMC/idade e sexo (CDC2000), sendo considerados abaixo do peso os abaixo do Percentil (P)18.5, peso normal entre P18.5-P24.9, excesso de peso entre P25-P29.9 e obesos  $\geq$  P30.

## **5.7. ANÁLISE DOS DADOS.**

Os resultados obtidos, exames coprológicos e respostas ao questionário, foram armazenados em software Excell 2008. O processamento dos dados foi feito no software SPSS v.17 e depois analisados.

A prevalência das parasitoses intestinais foi calculada de acordo com os critérios de Margolis *et al.* (1982). O teste de qui-quadrado ( $X^2$ ) foi utilizado para detectar diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre as variáveis em estudo. Os dados foram agrupados em tabelas de contingência de duas entradas e a análise foi efectuada com intervalo de confiança de 95%, de onde resultaram associações, estatisticamente significativa, quando o valor de “P” foi inferior ou igual a 0,05. O Software SPSS v.17 foi adoptado para a análise dos dados.

## **5.8. ENTREGA DOS RESULTADOS.**

Os resultados dos exames laboratorial foram entregues à directora da creche e foi feita a marcação de consulta, na própria creche, com os doentes parasitados. Uma médica voluntária dispôs-se a atender os doentes no local e de avaliar a necessidade terapêutica dos mesmos.

## **5.9. ASPECTOS ÉTICOS.**

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE. Sob a descrição da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre a participação de pessoas na pesquisa (CNS: Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996), disponível em <http://www.datasus.gov.br/conselho/resol96/res19696.htm>. As colheitas das amostras só se iniciaram após aprovação do referido comitê.

Os principais pontos trabalhados em relação às consideração ética são:

- a) da liberdade de participar ou não da pesquisa, tendo assegurada essa liberdade sem quaisquer represálias atuais ou futuras, podendo retirar o consentimento em qualquer etapa do estudo sem nenhum tipo de penalização ou prejuízo;
- b) da segurança de que não será identificado (a) e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a privacidade, a proteção da imagem e a não-estigmatização;
- c) da liberdade de acesso aos dados do estudo em qualquer etapa da pesquisa;
- d) da segurança de acesso aos resultados da pesquisa.



### **5.10. ANÁLISE CRÍTICA DE RISCOS OU DESCONFORTO PARA A POPULAÇÃO EM ESTUDO.**

Não houve riscos para a saúde dos participantes, havendo apenas recolha de fezes, e os pacientes positivos encaminhados para tratamento. Os participantes tiveram seus direitos preservados quanto à confidencialidade.

### **5.11. ANÁLISE CRÍTICA DE BENEFÍCIOS PARA A POPULAÇÃO EM ESTUDO.**

Este estudo permitiu analisar a prevalência de parasitoses intestinais e seus riscos de transmissão entre crianças matriculadas na creche, funcionários e seus filhos que não estavam matriculados na creche. As pessoas infectadas pelos parasitas identificados neste estudo foram encaminhadas para o(a) médico(a) que interpretou os resultados e avaliou a necessidade terapêutica dos mesmos. As medicações foram fornecidas, gratuitamente, pelo Posto de Saúde da Família (PSF) da região.

## 6. RESULTADOS

Na creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem, dos 135 participantes inclusos 69,6% (94) dispuseram-se a colaborar com a pesquisa. Assim, participaram neste estudo funcionários (n=18), filhos de funcionários não-matriculados na creche (n=18), crianças do berçário (n=13), crianças da turma G1 (n=11), crianças da turma G2 (n=12), crianças da turma G3 (n=5), crianças da turma G4 (n=9) e crianças da turma G5 (n=8). Dos 94 participantes cujas fezes foram analisadas, 43 (45,8%) estavam infectados por pelo menos um parasita e 51 (54,2%) apresentaram-se negativos. Entre os parasitados, 79% (n=34) encontravam-se monoparasitados e 21% (n=9) poliparasitados (Quadro 9). As associações mais observadas foram entre *G. duodenalis* / *Cryptosporidium* spp. 2 (25%), seguidas de *Cryptosporidium* spp. / *A. lumbricoides*, *G. duodenalis* / *Cryptosporidium* spp. / *E. histolytica*, *G. duodenalis* / *Cryptosporidium* spp. / *E. coli*, *G. duodenalis* / *E. histolytica* / *T. trichiura*, *Cryptosporidium* spp. / *E. nana* / *A. lumbricoides*, *Cryptosporidium* spp. / *S. mansoni* e *E. histolytica* / *A. lumbricoides* 1 (12,5%) cada.

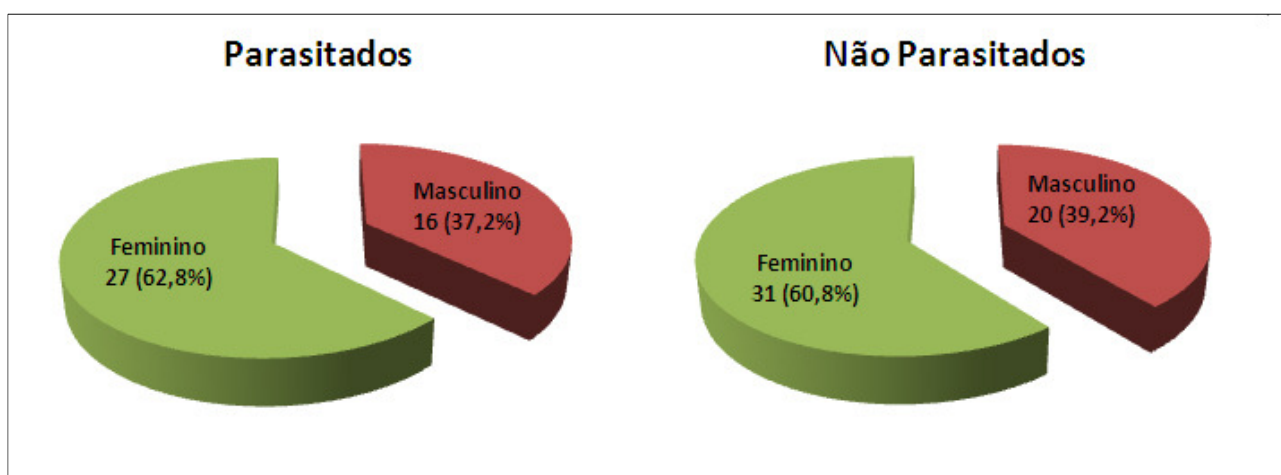
No total, foram estudadas 36 pessoas do sexo masculino, das quais 16 (37,2%) estavam parasitadas, e 58 do sexo feminino, estando 27 (62,8%) parasitadas (Gráfico I). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao gênero e à presença ou ausência de parasitismo entre os grupos.

Em relação à prevalência de protozooses e helmintoses, entre os 43 parasitados, 72% (n=31) encontravam-se parasitados com protozoários, 7% (n=3) por hemintas e 21% (n=9) por ambos. O protozoário mais prevalente foi *Cryptosporidium* spp. 23 (53,4%), seguido de *Giardia* sp. 19 (44,2%), *E. histolytica* 3 (6,9%), *E. coli* 2 (4,6%) e *E. nana* 1 (2,3%). O helminta mais prevalente foi *A. lumbricoides* 6 (13,9%), seguido de *T. trichiura* e *Schistosoma mansoni* 1 (2,3 %) cada (Quadro 10).

A faixa etária que apresentou maior prevalência de enteroparasitas foi a compreendida entre 3-6 anos (55,8%), seguida dos 7-14 (28%), 22-40 anos (23,2%), 1-2 anos (16,3%), < 1 ano (4,6%), 15-21 anos e  $\geq 41$  anos (2,3%) cada. A prevalência dos parasitas encontrados e a sua distribuição por faixa etária encontram-se apresentadas na Quadro 11.

**Quadro 9:** Prevalência das enteroparasitoses entre os 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010, e ocorrência de mono e poliparasitismo (poli) nos 43 participantes parasitados.

Grupos	Amostra	Positividade		Monoparasitismo		Poliparasitismo	
	N	n	%	n	%	n	%
Funcionários (F)	18	7	38,8	5	71,4	2	28,6
Filhos Funcionários (FF)	18	7	38,8	3	42,9	4	57,1
Berçário	13	9	69,2	9	100	0	0
G1 (Grupo 1)	11	3	27,27	3	100	0	0
G2 (Grupo 2)	12	6	50	6	100	0	0
G3 (Grupo 3)	5	3	60	3	100	0	0
G4 (Grupo 4)	9	4	44,44	2	50	2	50
G5 (Grupo 5)	8	4	50	3	75	1	25
Total	94	43	45,7	34	79	9	21



**Gráfico I:** Prevalência das enteroparasitoses em relação ao gênero dos 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010.

**Quadro 10:** Prevalência das enteroparasitoses evidenciadas nos 43 participantes infectados da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010.

Grupos	n	Protozoários										Helmintas					
		<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>G. duodenalis</i>		<i>E. histolytica</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. nana</i>		<i>A. lumbricoides</i>		<i>T. trichiura</i>		<i>S. mansoni</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Funcionários	7	7	100	1	14,3	1	14,3	-	-	1	14,3	1	14,3	-	-	-	-
Filhos de Funcionários	8	3	37,5	3	37,5	2	25	1	12,5	-	-	2	25	1	12,5	1	12,5
Berçário	7	4	57,1	4	57,1	-	-	-	-	-	-	1	14,3	-	-	-	-
Turma G1	3	-	-	3	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Turma G2	8	3	37,5	2	25	-	-	-	-	-	-	1	12,5	-	-	-	-
Turma G3	3	1	33,3	2	66,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Turma G4	4	3	75	2	50	-	-	-	-	-	-	1	25	-	-	-	-
Turma G5	3	2	66,6	2	66,6	-	-	1	33,33	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	43	23	53,4	19	44,2	3	6,9	2	4,6	1	2,3	6	13,9	1	2,3	1	2,3

**Quadro 11:** Prevalência das enteroparasitoses evidenciadas nos 43 pacientes infectados, segundo faixa etária, da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010.

Parasitas mais prevalentes	Idade (em anos)													
	< de 1		1 a 2		3 a 6		7 a 14		15 a 21		22 a 40		≥ de 41	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>G. duodenalis</i> (n=19)	1	5,3	3	15,8	12	63,1	3	15,8	-	-	1	5,3	-	-
<i>E. histolytica</i> (n=3)	-	-	-	-	-	-	2	66,6	-	-	1	33,3	-	-
<i>E. coli</i> (n=2)	-	-	-	-	1	50	1	100	-	-	-	-	-	-
<i>E. nana</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100	-	-
<i>Cryptosporidium</i> spp. (n=23)	1	4,3	3	13	9	39,1	3	13	-	-	6	26	1	4,3
<i>A. Lumbricoides</i> (n=6)	-	-	1	16,6	2	33,3	1	16,6	1	16,6	1	16,6	-	-
<i>T. trichiura</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	1	100	-	-	-	-	-	-
<i>S. mansoni</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	1	100	-	-	-	-	-	-
Total	2	4,6	7	16,3	24	55,8	12	28	1	2,3	10	23,2	1	2,3

O questionário epidemiológico foi respondido pelos 94 (100%) participantes desta pesquisa. A análise dos questionários respondidos pelos funcionários e responsáveis pelas crianças, revelou os seguintes resultados, relativos aos principais atributos epidemiológicos relacionados as condições de higiene e saneamento: 83% afirmaram possuir água ligada à rede pública, 12,8% afirmaram utilizar água de poço e 4,2% assinalaram utilizar ambos os sistemas de utilização hídrica; 58,5% afirmaram destinar o esgoto a céu-aberto, 32% afirmaram utilizar fossa dentro de suas propriedades e 9,5% assinalaram utilizar ambos os sistemas de esgotamento sanitário; 94,7% afirmaram não possuir animais domésticos em sua residência; 24,5% afirmaram lavar as mãos antes das refeições e após uso da casa de banho (higiene completa das mãos), 34% afirmaram não efectuar com frequência a higiene das mãos antes das refeições e após uso da casa de banho (higiene incompleta das mãos) e 41,5% afirmaram não ter tais costumes de higiene; 57,4% afirmaram utilizar apenas chuveiro para banhar-se, 24,4% costumam utilizar apenas balde para banhar-se e 18% afirmaram banhar-se de ambas as formas. Os dados obtidos pelo questionário epidemiológico estão apresentados no Quadro 12.

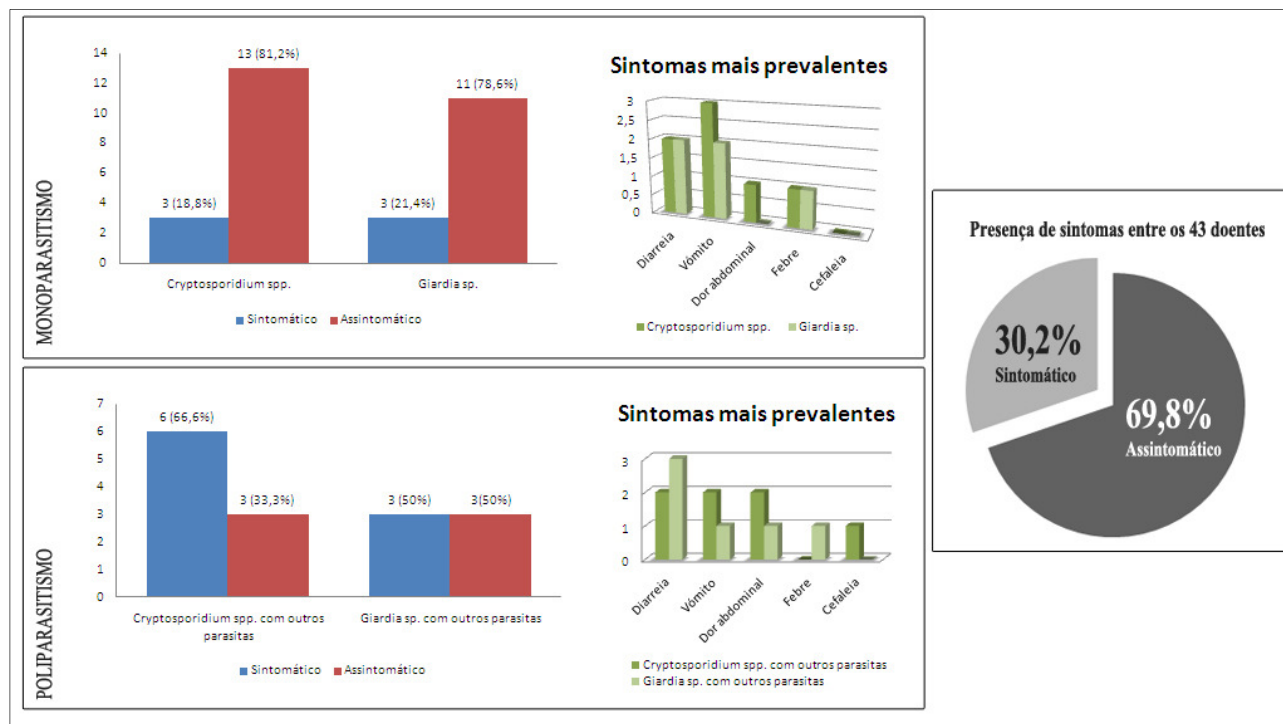
Quanto à presença de sintomas entre os 43 parasitados, 69,8% (n=30) apresentavam-se com quadro assintomático e 30,2% (n=13) sintomáticos. Dentre os monoparasitados sintomáticos, o sintoma relatado com maior prevalência foi vômito (71,4%), seguido de diarreia (57,1%), dor abdominal e febre (28,6%) cada. Nos poliparasitados, o sintoma relatado com maior prevalência foi diarreia e dor abdominal (50%) cada, seguido de vômito (33,3%) e cefaleia (16,6%). Quando foi analisada a presença de sintomas nos doentes monoparasitados com *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis*, prevaleceram os casos assintomáticos (81,2% e 78,6% respectivamente). Quanto à presença de sintomas nos doentes poliparasitados, com os parasitas supracitados, prevaleceram os casos sintomáticos (66,6% e 50% respectivamente). Nos casos de monoparasitismo por *Cryptosporidium* spp. o sintoma mais prevalente foi vômito (100%), porém nos casos de poliparasitismo envolvendo este parasita o sintoma mais prevalente foram vômito, diarreia e febre (33,3%). Nos casos de monoparasitismo por *G. duodenalis* o sintoma mais prevalente foi diarreia

(100%). A prevalência dos sintomas encontrados e a sua distribuição por parasitas encontram-se apresentados na Gráfico II.

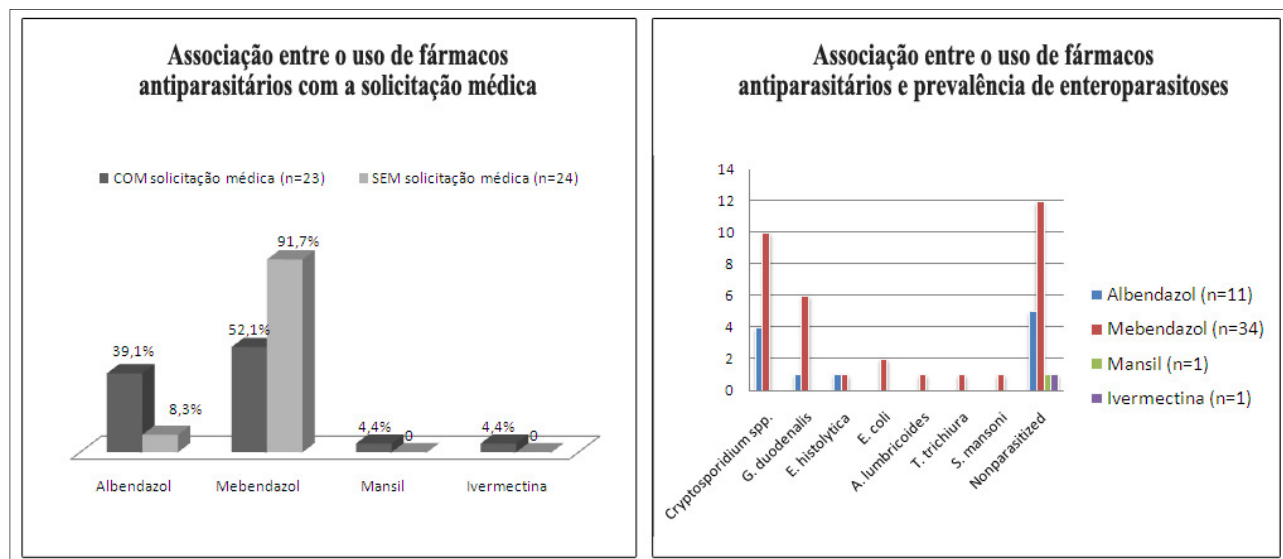
Tendo em consideração os 94 entrevistados, 47 (50%) já haviam sido medicados e/ou medicavam seus filhos com fármacos antiparasitários, entre os quais 23 (48,9%) faziam-no por indicação médica após análise coprológica e 24 (51%) sem indicação médica e análise coprológica. Dentre os fármacos utilizados sem solicitação médica, o relatado com maior prevalência foi Mebendazol 22 (91,7%), seguido de Albendazol 2 (8,3%). Entretanto, quanto aos fármacos utilizados com solicitação médica, o relatado com maior prevalência foi Mebendazol 12 (52,1%), seguido de Albendazol 9 (39,1%), Mansil e Ivermectina 1 (4,4%) cada. Quando analisámos os dados da associação entre a utilização de fármacos e a prevalência de enteroparasitoses, dos 11 doentes que medicaram-se com Albendazol, 4 (36,3%) encontravam-se parasitados por *Cryptosporidium* spp. e 1 (9%) por *G. duodenalis* e *E. histolytica* cada. Tendo em conta os 34 participantes que utilizaram Mebendazol, 10 (29,4%) encontravam-se parasitados por *Cryptosporidium* spp., 6 (17,6%) por *G. duodenalis*, 2 (5,8%) por *E. coli* e 1 (2,9%) por *E. histolytica*, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni*, cada (Gráfico III).

O estado nutricional mais prevalente nos 43 participantes parasitados foi “peso normal” 17 (39%), seguido de “obeso” 14 (33%), “excesso de peso” 11 (26%) e “abaixo do peso” 1 (2%). Entre os 51 pacientes não parasitados, o estado nutricional mais prevalente foi “peso normal” 29 (57%), seguido de “excesso de peso” 12 (23%), “obeso” 7 (14%) e “abaixo do peso” 3 (6%) (Gráfico IV). A distribuição dos parasitas encontrados, de acordo com o estado nutricional, e os distúrbios nutricionais, de acordo com a faixa etária e o género, encontram-se sumarizados nos Quadros 13 e 14, respectivamente.

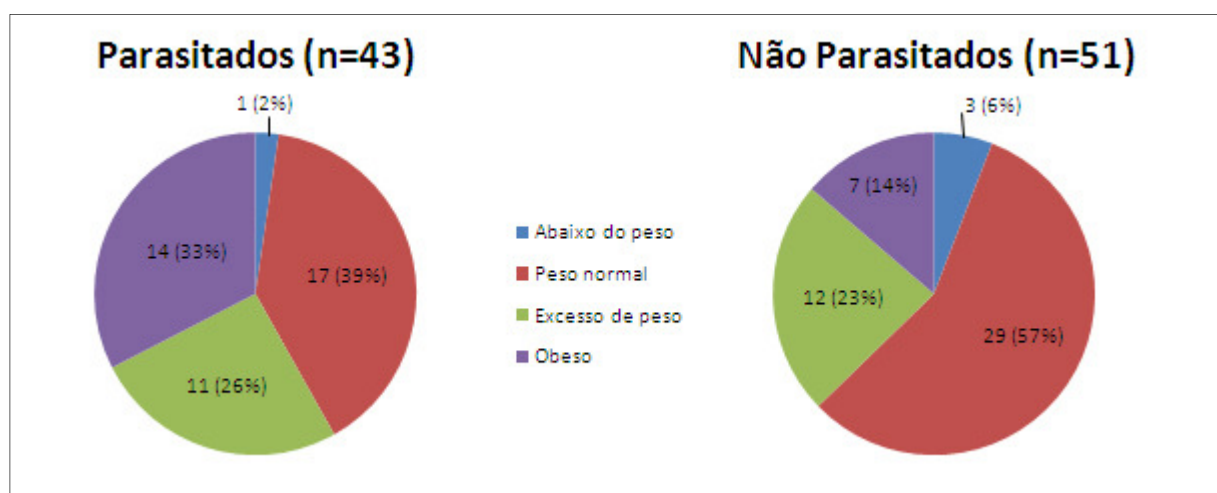
Os hábitos alimentares dos entrevistados encontram-se apresentados no Gráfico V.



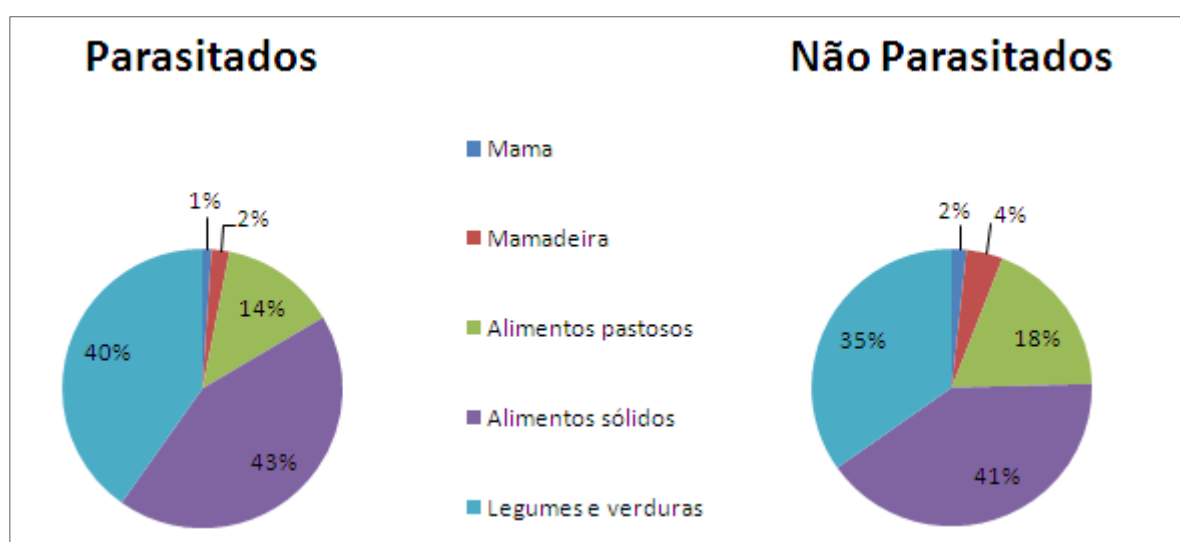
**Gráfico II:** Presença de sintomas mais relatados pelos 43 participantes infectados da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010, e suas associações com os parasitas encontrados.



**Gráfico III:** Associação entre o uso de fármacos antiparasitários com a solicitação médica de exame coprológico e prevalência de enteroparasitoses entre os 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010.



**Gráfico IV:** Distribuição dos distúrbios nutricionais encontrados nos 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010.



**Gráfico V:** Hábitos alimentares dos 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010.

**Quadro 13:** Distribuição dos enteroparasitas encontrados nos 43 parasitados da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem da comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010, de acordo com o estado nutricional.

Parasitas / Total	Abaixo do peso	Peso normal	Excesso de peso	Obeso
<i>G. duodenalis</i> (n=19)	1 (5,2%)	7 (37%)	2 (10,5%)	9 (47,3%)
<i>E. histolytica</i> (n=3)	-	-	1 (33,3%)	2 (66,6%)
<i>E. coli</i> (n=2)	-	-	1 (50%)	1 (50%)
<i>E.nana</i> (n=1)	-	-	1 (100%)	-
<i>Cryptosporidium spp.</i> (n=23)	-	11 (47,8%)	7 (30,5%)	5 (21,7%)
<i>A. lumbricoides</i> (n=6)	-	3 (50%)	3 (50%)	-
<i>T. trichiura</i> (n=1)	-	-	-	1 (100%)
<i>S. mansoni</i> (n=1)	-	-	-	1 (100%)



**Quadro 12:** Principais atributos epidemiológicos relacionados com as condições de higiene e saneamento dos 94 participantes da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem localizada na comunidade “Entra A Pulso”, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010.

Questões	Respostas								
	Total dos Entrevistados (n=94)			Parasitados (n=43)			Não Parasitados (n=51)		
Qual tipo de abastecimento de água na residência?	83% encanada	12,8% poço	4,2% ambos	83,7% encanada	9,3% poço	7% ambos	82,3% encanada	15,7% poço	2% ambos
Qual o destino do esgoto?	58,5% céu-aberto	32% fossa	9,5% ambos	60,5% céu-aberto	25,5% fossa	14% ambos	56,9% céu-aberto	37,2% fossa	5,9% ambos
Possuem animais domésticos?	5,3% sim	94,7% não		7% sim	93% não		5,8% sim	94,2% não	
Efetua a lavagem das mãos antes das refeições e após uso da casa de banho?	24,5% completa	34% incompleta	41,5% não	14% completa	46,5% incompleta	39,5% não	33,3% completa	23,5% incompleta	43,2% não
Qual a forma de banhar-se?	57,4% chuveiro	24,4% balde	18% ambos	55,8% chuveiro	25,5% balde	18,6% ambos	58,8% chuveiro	23,5% balde	17,6% ambos

**Quadro 14:** Distribuição dos estados nutricionais encontrados nos 43 doentes parasitados da creche comunitária Nossa Senhora de Boa Viagem da comunidade Entra A Pulso, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil, no período de Outubro de 2009 a Julho de 2010, de acordo com a faixa etária e género.

NÃO parasitados (Masculino)						Parasitados (Masculino)					
0-6 anos (n=15)		7-15 anos (n=4)		≥ 16 anos (n=1)		0-6 anos (n=11)		7-15 anos (n=5)		≥ 16 anos (n=0)	
Abaixo do peso	1 (7%)	Abaixo do peso	1 (25%)	Abaixo do peso	0	Abaixo do peso	1 (9,1%)	Abaixo do peso	0	Abaixo do peso	0
Peso normal	11 (73%)	Peso normal	1 (25%)	Peso normal	1 (100%)	Peso normal	4 (36,4%)	Peso normal	2 (40%)	Peso normal	0
Excesso de peso	3 (20%)	Excesso de peso	1 (25%)	Excesso de peso	0	Excesso de peso	1 (45,4%)	Excesso de peso	2 (40%)	Excesso de peso	0
Obeso	0	Obeso	1 (25%)	Obeso	0	Obeso	5 (9,1%)	Obeso	1 (20%)	Obeso	0
NÃO parasitados (Feminino)						Parasitados (Feminino)					
0-6 anos (n=17)		7-15 anos (n=4)		≥ 16 anos (n=10)		0-6 anos (n=19)		7-15 anos (n=1)		≥ 16 anos (n=7)	
Abaixo do peso	0	Abaixo do peso	0	Abaixo do peso	0	Abaixo do peso	0	Abaixo do peso	0	Abaixo do peso	0
Peso normal	9 (53%)	Peso normal	2 (50%)	Peso normal	3 (30%)	Peso normal	9 (47,4%)	Peso normal	0	Peso normal	3 (43%)
Excesso de peso	5 (29%)	Excesso de peso	1 (25%)	Excesso de peso	6 (60%)	Excesso de peso	5 (26,3%)	Excesso de peso	1 (100%)	Excesso de peso	1 (14%)
Obeso	3 (18%)	Obeso	1 (25%)	Obeso	1 (10%)	Obeso	5 (26,3%)	Obeso	0	Obeso	3 (43%)

A análise da relação entre os protozoários mais prevalentes e algumas das variáveis clínicas e demográficas consideradas no presente estudo, permitiu a observação de associações significativas entre: 1) presença de parasitismo por *Cryptosporidium* spp. e grupos estudados, com maior prevalência (100%) nos funcionários ( $P=0,01$ ); 2) saneamento básico e baixo índice de parasitismo por *Cryptosporidium* spp., com maior prevalência (95%) de esgoto a céu-aberto ( $P=0,004$ ); 3) abastecimento de água e baixo índice de parasitismo por *E. histolytica*, com maior prevalência (95%) de presença de água procedente da rede pública ( $P=0,019$ ); 4) parasitismo por *E. histolytica* e faixa etária, com maior prevalência (66,7%) entre os 7-14 anos ( $P=0,032$ ); 5) Presença de parasitismo por *G. duodenalis* e estado nutricional, com maior prevalência (71,4%) em doentes obesos ( $P=0,021$ ).

No que se refere ao fenómeno de poliparasitismo, verificou-se que a maioria (82,6%) dos indivíduos parasitados com *Cryptosporidium* spp., não se encontravam parasitados com *Giardia* sp. ( $P=0,0001$ ), bem como a maioria (100%) dos indivíduos infectados por *Giardia* sp. não se encontravam parasitados por *A. lumbricoides* ( $P=0,027$ ).

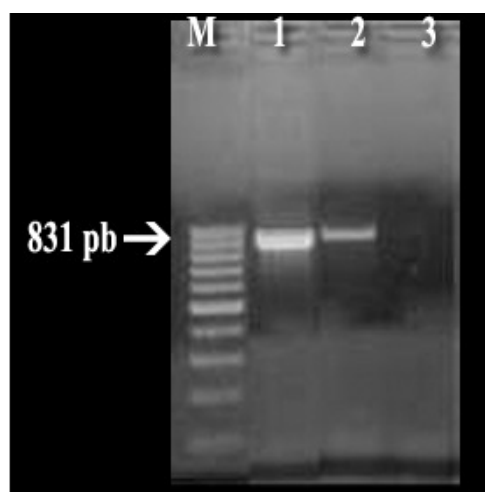
A análise estatística entre helmintas mais prevalentes a variáveis em estudo permitiram observar associações estatisticamente significativas entre: 1) presença de parasitismo por *A. lumbricoides* e estado nutricional, com maior prevalência (66,7%) de doentes com excesso de peso ( $P=0,02$ ); 2) parasitismo por *A. lumbricoides* e sintomatologia, com maior prevalência (60%) de dor abdominal ( $P=0,014$ ); 3) parasitismo por helmintas e faixa etária, com maior prevalência (60%) na faixa entre 7-14 anos ( $P=0,037$ ).

Após a comparação entre o tipo de abastecimento de água e as variáveis em estudo encontrou-se associação significativa entre: 1) ter água de poço e parasitismo, com menor prevalência (13,9%) de poliparasitismo ( $P=0,026$ ) e maior prevalência (15,4%) de parasitismo por *E. histolytica* ( $P=0,049$ ); 2) ter água canalizada da rede pública e parasitismo, com menor prevalência (25%) de poliparasitismo ( $P=0,024$ ) e menor prevalência (5%) de parasitismo por *E. histolytica* ( $P=0,019$ ).

No que se referente à comparação entre a sintomatologia e algumas das variáveis em estudo, encontrou-se associação significativa entre: 1) ter sintomas e parasitismo, com maior prevalência (62,5%) de parasitismo com helmintas ( $P=0,042$ ) e maior prevalência (66,7%) de poliparasitados ( $P=0,014$ ); 2) ter dor abdominal e parasitismo, com maior prevalência (50%) no parasitismo por *A. lumbricoides* ( $P=0,014$ ) e maior prevalência (80%) nos parasitados com helmintas ( $P=0,003$ ).

No que se refere ao estado nutricional e as variáveis em estudo, encontrou-se associação significativa entre: 1) excesso de peso e parasitismo, com menor prevalência (14,7%) de monoparasitados ( $P=0,02$ ) e menor prevalência (37,5%) de helmintoses ( $P=0,01$ ).

Todas as 94 amostras foram submetidas à técnica de *nested*-PCR aplicada ao *locus* da subunidade pequena de RNA ribossômico (SSU-rRNA) de *Cryptosporidium*. Da amplificação por PCR de uma região do gene SSU-rRNA, obteve-se um fragmento de 831 pb, conforme descrito por Xiao *et al.* (1999). Na figura 5 pode-se observar o produto da amplificação do gene SSU-rRNA após a realização de *nested*-PCR.

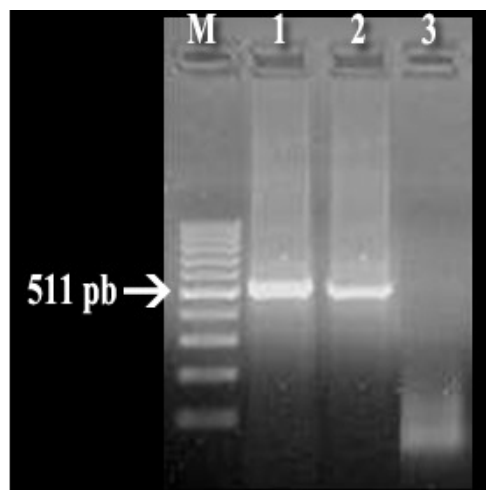


**Figura 5:** Gel de agarose a 2%, após electroforese dos produtos de amplificação do gene SSU-rRNA em isolados de *Cryptosporidium* spp. M: marcador de pesos moleculares (100 pb ladder); linhas 1: produto de PCR do DNA extraído das fezes; linha 2: controle positivo de DNA de *Cryptosporidium*; linha 3: controle negativo.

Das 94 amostras analisadas, 15 foram positivas através do diagnóstico parasitológico, para *Cryptosporidium* spp., 23 amostras foram positivas por PCR. Dos 23 casos positivos por PCR,

confirmaram-se, através da análise de sequências, que o DNA amplificado por *nested*-PCR corresponde a *C. parvum*.

Da amplificação, por *nested*-PCR, do DNA de *Giardia* sp., com *primers* específicos (referidos no capítulo material e métodos), obtiveram-se fragmentos de 511 pb do gene da  $\beta$ -giardina, conforme descrito por Cacciò *et al.* (2002) e Lalle *et al.* (2005) (Figura 6).



**Figura 6:** Gel de agarose a 2%, após electroforese dos produtos de amplificação do gene  $\beta$ -giardina em isolados de *Giardia* sp. M: marcador de pesos moleculares (100 pb ladder); linhas 1: produto de PCR do DNA extraído das fezes; linha 2: controle positivo de DNA de *Giardia duodenalis*; linha 3: controle negativo.

De um total de 19 casos positivos obtidos para *Giardia* sp. por diagnóstico parasitológico, apenas cinco foram confirmados por PCR. Determinou-se, através da análise de sequências, que o DNA amplificado por PCR corresponde à espécie *G. duodenalis*.

## 7. DISCUSSÃO

As crianças e funcionários que participaram deste estudo habitam áreas com carência no sistema de saneamento básico e abastecimento de água, residindo em uma comunidade popular considerada como favela no município de Recife.

Os resultados desta pesquisa mostraram uma alta prevalência de enteroparasitoses (45,8%) no grupo estudado, como já foi observado em outros estudos em creches de áreas com carência de saneamento básico no Brasil. A prevalência das enteroparasitoses em creches de várias cidades do Brasil variam entre 15% à 64%. (Komagome *et al.*, 2007; Barçante *et al.*, 2008; Barnabé *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008; Zaiden *et al.*, 2008; Biscegli *et al.*, 2009). Esse facto provavelmente deve-se ao nível sócio-econômico e cultural que influenciam as condições de higiene pessoal e cuidados com a água e os alimentos, podendo-se inferir que em classes menos favorecidas estes cuidados não são rigorosamente observados. Além disso, crianças de creches têm maior contacto íntimo entre si, o que favorece a transmissão pessoa-a-pessoa.

No que diz respeito aos géneros, não houve diferença significativa estatisticamente na prevalência de parasitoses entre os sexos masculino (43,2%) e feminino (47,3%), concordando com outros estudos anteriores (Gurgel *et al.*, 2005; Barçante *et al.*, 2008; Zaiden *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2008; Biscegli *et al.*, 2009). Entretanto, este resultado foi contrário aos achados de Machado *et al.* (1999) e Faleiros *et al.* (2004) que encontraram prevalências maiores em crianças do sexo masculino. No entanto, esses resultados da contaminação por enteroparasitos em crianças, segundo o sexo, remetem às afirmações de autores como Mendonza *et al.* (2001), Quadros *et al.* (2004) e Beck *et al.* (2005) que colocam resultados conflituosos entre a incidência de enteroparasitoses em crianças de ambos os sexos, em função do estilo de vida.

Os casos de monoparasitismo (79%) prevaleceram sobre poliparasitismo (21%) entre os participantes. Sendo importante considerar a ocorrência de associações entre parasitas envolvendo protozoários patogênicos como *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *E. histolytica*. O poliparasitismo verificado pode ser justificado pelo facto de os parasitas envolvidos apresentarem o mesmo mecanismo de transmissão, actuando como bons indicadores das condições sócio-sanitárias, podendo fornecer melhor entendimento da epidemiologia das parasitoses que estão relacionadas diretamente à redução do crescimento, má absorção de nutrientes e danos à mucosa intestinal (Rocha *et al.*, 2000).

Neste estudo, prevaleceu um maior número de casos de protozooses (72%) do que de helmintoses (7%) de forma semelhante ao encontrado por autores como Armengol *et al.* (1997), Saldiva *et al.* (1999), Prado *et al.* (2001) e Uchoa *et al.* (2001), havendo diferença estatisticamente significativa ( $P=0,005$ ). Esse facto provavelmente deve-se ao mecanismo de disseminação dos mesmos, que difere dos helmintas, por os protozoários encontrados serem monoxênicos, terem transmissão pessoa-a-pessoa e através da alimentação, água e mãos contaminadas. Vale considerar que os parasitas heteroxênicos necessitam de outro hospedeiro para completar seus estágios de desenvolvimento e estarem habilitados a causar lesões. Outra possível explicação para a baixa prevalência de helmintas é a utilização de anti-helmínticos pelas crianças que recebem o medicamento como forma de profilaxia primária na creche.

O protozoário mais prevalente observado neste estudo foi *Cryptosporidium* spp. (53,4%), seguido de *G. duodenalis* (44,2%). A criptosporidiose é uma protozoose emergente que infecta o trato gastrointestinal de animais e do homem, sendo este protozoário observado em crianças brasileiras institucionalizadas ou não, com prevalência variando entre 1,1% e 35%, resultados estes inferiores aos verificados neste estudo. O segundo protozoário mais prevalente, *G. duodenalis*, observado neste estudo, apresentou prevalência semelhante a outros estudos realizados em creches por outros autores (19% a 75%). A observação da maior prevalência de *Cryptosporidium* spp., verificado neste estudo, pode ser justificada pela utilização de técnicas específicas para detecção

deste parasita nas amostras: PCR e coloração pelo Ziehl-Neelsen após concentração das fezes pelo método de Ritchie modificado. Estes resultados são contrários aos descritos noutros estudos sobre a prevalência de enteroparasitoses em creches, que apontam *G. duodenalis* como sendo o parasita mais prevalente nestes ambientes. Nestes estudos porém, não foram utilizadas técnicas específicas para pesquisa de *Cryptosporidium* como a PCR (Costa-Macedo *et al.*, 1998; Uchoa *et al.*, 2004; Zaiden *et al.*, 2008; Biscegli *et al.*, 2009). Entretanto, os resultados do presente estudo concordam com Nascimento *et al.* (2009) que efetuaram um estudo de prevalência de *Cryptosporidium* spp. em uma creche pública da cidade de Recife (Brasil) e encontraram uma alta prevalência (32%) deste parasita nesta instituição, tendo utilizado apenas a técnica Ziehl-Neelsen modificada, coloração com fucsina-carbólica (método Kinyoun).

De um total de 19 casos positivos obtidos no diagnóstico parasitológico, para *Giardia* sp., apenas cinco foram confirmados pela PCR. Uma vez que esta técnica apresenta uma elevada sensibilidade, estes resultados negativos poderão dever-se, essencialmente, aos seguintes factores: (i) a presença de inibidores *Taq* polimerase, nas fezes, como a bilirrubina, os sais biliares e polissacáridos complexos, que não são totalmente removidos, pelos processos de extração de DNA (Gelanew *et al.*, 2007; Nantavisai *et al.*, 2007); (ii) a dificuldade de extrair DNA a partir de quistos de *Giardia* (Cook *et al.*, 2002; Nantavisai *et al.*, 2007); (iii) a possível perda de material, no decorrer da realização dos métodos de extração; (iv) o facto de estas amostras apresentarem carga parasitária baixa, que juntamente com o factor (iii), poderão explicar a ausência de amplificação.

Dentre os helmintas, *A. lumbricoides* foi o mais prevalente (15%) concordando com outros estudos que apontam uma prevalência semelhante (1,5% à 12%) (Chaves *et al.*, 2006; Mascarini & Donalísio, 2006; Komagome *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2008; Barçante *et al.*, 2008; Barnabé *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008; Zaiden *et al.*, 2008; Biscegli *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2009). Uma justificação para esta prevalência observada de helmintas, poderá advir do facto de que ovos de *A. lumbricoides* permanecem no ambiente durante anos, assim como outros geohelmintas que compartilham as mesmas formas de transmissão. Na creche, a presença desse geohelminta indica

que a transmissão pode estar ocorrendo nos ambientes de terra, nos quais as crianças brincam, veiculados por alimentos e pela falta de educação sanitária.

No presente trabalho, a maior prevalência de parasitas intestinais foi verificada na faixa etária de 3-6 (55,8%) anos, sendo *G. duodenalis* (50%) e *Cryptosporidium* spp. (37,5%) os parasitas mais prevalentes nas crianças compreendidas nesta faixa etária, embora o resultado não tenha sido significativo ( $P=0,095$ ), concordando com dados preliminares de vários autores que verificaram um maior número de indivíduos infectados dentro da faixa etária de 3-12 anos sendo a giardíase a enteroparasitose mais prevalente nesta faixa etária (Ludwing *et al.*, 1999; Gurgel *et al.*, 2005; Komagome *et al.*, 2007; Biscegli *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2009). Este resultado pode ser justificado pelo facto de que crianças compreendidas nesta faixa etária, têm maior autonomia, maior contacto com o solo e com outras crianças, o que favorece a contaminação por parasitas, inclusive com maior diversidade de espécies. Quando analisamos a presença do protozoário *Cryptosporidium* spp. nas demais faixa etárias, verificamos uma alta prevalência (26%) na faixa entre 22-40 anos ( $P=0,023$ ), na qual estão compreendidos os funcionários. A detecção dos mesmos protozoários intestinais patogénicos, tais como *Cryptosporidium* spp., *G. duodenalis* e *E. histolytica*, nas crianças e nos adultos pode indicar transmissão pessoa-a-pessoa, das crianças para os funcionários ou vice-versa, no entanto, não foi possível demonstrar a transmissão pessoa-a-pessoa pois vários outros factores interferem na transmissão dos agentes, como a deficiência de saneamento e abastecimento da água da comunidade e qualidade dos alimentos, embora a mesma possa estar ocorrendo. Por outro lado, a alta prevalência destes agentes indicam, também, consumo de água e ou alimentos contaminados por material fecal de origem humana, ou ingestão do quistos/ooquistos a partir de mãos contaminadas, diretamente ou na manipulação de alimentos. Este resultado pode ser justificado pelo facto de que crianças compreendidas nesta faixa etária, estão em contacto maior com o solo e com outras crianças da comunidade, o que favorece a contaminação por parasitas, inclusive com maior diversidade de espécies.



Alguns autores referem que nesta faixa etária as crianças passam por mudanças quanto à resposta imune aos enteroparasitas e também nos hábitos pessoais, sociais e alimentares, tais como introdução de alimentos crus na dieta, diminuição dos cuidados diretos, maior contacto com o solo, com outras crianças e animais domésticos, sendo importante a implementação de medidas preventivas primárias e secundárias. Também chamam a atenção para o facto de que a resposta imune aumenta com a idade e a exposição ao parasita (Costa-Macedo *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 1999; Bórquez *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2000; Scolari *et al.*, 2000; Uchoa *et al.*, 2001; Carneiro *et al.*, 2002; Bezerra *et al.*, 2003; Nolla & Cantos, 2005).

Entre as variáveis consideradas diretamente relacionadas às enteroparasitoses, está a qualidade de água disponível à população, uma vez que, a mesma, é um importante veículo de transmissão de enteroparasitoses e explica alguns factores epidemiológicos envolvidos na predisposição dos grupos estudados à contaminação (Nuñez *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Heller *et al.*, 2004; Costamagna *et al.*, 2005).

No presente estudo 83,3% da população investigada residiam em casas cujo abastecimento de água era proveniente da rede pública, 12,6% por poços e 4,2% por ambas as formas. Com base nestes dados é possível afirmar que a água que chega, na grande maioria, às residências dos participantes do estudo passa por um tratamento prévio, que inclui retirada de sólidos, filtração e cloração, procedimentos estes adequados à produção de uma água de qualidade razoável para o consumo.

A principal fonte de água disponível, proveniente da rede pública de abastecimento, também pode ter influenciado pelo facto de mais da metade da população estudada ter apresentado resultados negativos (51; 54,2%) quanto às parasitoses, embora este resultado não tenha sido significativo estatisticamente. Porém não descarta a possibilidade da mesma ter influenciado na contaminação da população em estudo, pois, protozoários como *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* apresentam grande resistência às condições ambientais e aos desinfectantes químicos empregados para potabilizar a água, tais como cloro, cloraminas ou dióxido de cloro, assumindo

assim grande relevância para os sistemas de abastecimento público de água (Dyksen *et al.*, 1998). Entretanto, vários surtos de doenças de veiculação hídrica têm sido relatados, associados ao consumo de água de sistemas públicos de abastecimento. Dentre esses episódios, destaca-se o de Milwaukee (US) em 1993 onde estimou-se que 403.000 pessoas contraíram criptosporidiose, das quais 4.400 foram hospitalizadas (Rose, 1997; Fayer *et al.*, 2000). No período de 1989 a 1999, 21 surtos de criptosporidiose foram relatados afetando aproximadamente 481.126 pessoas (Fayer *et al.*, 2000) sendo estas águas enquadradas ao padrão de potabilidade exigidos. Neto (2004) em seus estudos, pesquisou a ocorrência de quistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de uma estação de tratamento em Campinas (SP-Brasil) encontrando a presença de 90% de quistos de *Giardia* sp. nas amostras analisadas, não tendo, entretanto, observado a presença de *Cryptosporidium* spp. nestas amostras.

A segunda principal fonte de água disponível para a população neste estudo foi através de água de poço (12,6%). O manancial subterrâneo é um recurso utilizado por ampla parcela da população brasileira (15,6%), porém uma das principais fontes de contaminação desses lençóis freáticos são os esgotos que são lançados *in natura* no solo. A contaminação da água subterrânea de poços e sistemas de distribuição com bactérias do grupo coliformes foi registrada entre os anos de 1994 e 1999 quando a Agencia de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) constatou violação nos níveis máximos de contaminantes em 25,6% (40.000/156.000) das amostras analisadas. A USEPA (1994) listou mais de 100 patógenos virais e bacterianos que podem ocorrer nas águas subterrâneas, incluindo espécies de *Giardia* e de *Cryptosporidium*, apesar de que a presença destes protozoários em água subterrânea indica influência da água superficial. A maioria desses organismos é de origem fecal e são transmitidos por uma rota de exposição fecal-oral (Macler e Merkle, 2000). No Brasil, o cenário actual é caracterizado pela progressiva contaminação das águas superficiais e subterrâneas devido à deficiente infra-estrutura do sistema de esgotamento sanitário (FUNASA - Fundação Nacional de Saúde; Ministério de Saúde). Dos 5.507 municípios existentes em 2000, 47,8% não dispõe de redes de esgoto sanitário e os principais receptores do esgoto *in natura*, não tratados, são

os rios e o mar o que compromete a qualidade de água utilizada para o abastecimento, irrigação e recreação (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística, 2000). Vários surtos epidêmicos decorrentes da ingestão das águas subterrâneas foram associados a deficiência no sistema de distribuição de água ou poços e nascentes que não foram adequadamente protegidos da contaminação por esgotos ou fezes de animais drenadas das áreas de pastagem após a ocorrência de chuvas (Craun *et al.*, 1998; Searcy *et al.*, 2006). Nos últimos anos, as investigações sobre a ocorrência destes protozoários patogênicos no ambiente aquático vêm aumentando significativamente no Brasil. Ooquistos foram detectados em água de consumo humano (Toms, 1998), em esgoto e águas superficiais (Ré, 1999; Dias-Junior, 1999; Farias *et al.*, 2002), em águas de poços subterrâneos (Gamba *et al.*, 2000) e tratadas (Muller, 2000), mediante o emprego de precipitação química ou filtração em membranas. Diante destes factos, a utilização de águas de poços na residência dos participantes desta pesquisa pode estar relacionada com a transmissão das enteroparasitoses encontradas.

É do conhecimento geral que o destino dado aos dejectos é um factor preponderante na disseminação das enteroparasitoses. Ao obter-se junto aos responsáveis pelas crianças, as informações referentes ao destino dos dejectos humanos, observou-se que 58,5% referiram lançá-los em esgotos a céu-aberto. Os restantes, 32% informaram utilizar fossa e 9,5% referiram utilizar combinação de esgoto a céu-aberto e fossa. Estes resultados demonstram a total falta de saneamento básico nesta comunidade, mostrando que nenhum dos entrevistados residiam em casas que possuíam instalações com rede de esgoto público o que, de forma direta ou indireta, poderia contribuir para o declínio das enteroparasitoses e melhoria das condições de vida, além da preservação do ambiente. A exemplo dessa preocupação, Ludwing *et al.* (1999) numa tentativa correlacionou as condições de saneamento básico e as parasitoses intestinais, observaram que a frequência de parasitoses diminuiu com o aumento do número de ligações de água e esgoto. Da população estudada, a veiculação fecal, factor de predisposição às parasitoses, mostrou significância estatística quando confrontada com a presença de organismos patogênicos ( $P=0,004$ ). Concordando

com os resultados encontrados por Mello e Bohland (1999) que associaram a prevalência de enteroparasitoses às condições ambientais e verificaram que 96,2% das crianças apresentaram resultados positivos quanto às parasitoses intestinais. No entanto, apenas 4,8% dos domicílios analisados possuíam instalações sanitárias com rede de esgoto. Essas realidades reforçam as considerações de Paulino *et al.* (2001) e Semenas *et al.* (1999) sobre a necessidade de melhoria no saneamento básico, disponibilizando mais rede de esgoto à população, em relação a sistemas não tratados como fossas a céu-aberto, melhorando assim, também, o próprio ambiente.

A higiene pessoal como tomar banho todos os dias, lavar as mãos antes das refeições e após defecação, entre outras, são medidas básicas e necessárias para uma boa saúde, e deve acontecer individual e diariamente. Nesse trabalho 58% dos entrevistados fazem a sua higiene em chuveiros, 24,2% com banhos de assento e 17,8% banham-se de ambas as formas. Possivelmente, pela maior parcela dos entrevistados banharem-se de chuveiro, este poderia ser um factor que contribuisse para que mais da metade da população pesquisada esteja livre das parasitoses, embora não tendo significância estatística. Outro aspecto de limpeza pessoal, de maior importância, é o hábito de lavar as mãos. Dos 94 participantes deste estudo, 39 (41,5%) afirmaram não lavam as mãos antes das refeições e após uso de casa de banho, contra 23 (24,2%) dos que fazem asseios completos. Estes resultados, embora em percentagem elevada mas sem significância estatística, é um dos factores predisponentes às enteroparasitoses. Tal como no presente trabalho, Nuñez *et al.* (2003) não encontraram diferenças significativas tanto quanto ao hábito de lavar as mãos antes das refeições, quanto após o uso de sanitários. No entanto, Bezerra *et al.* (2003) evidenciaram que a falta de higiene pessoal é fonte de contaminação, transmissão e autoinfecção, reforçando a necessidade de intervenção educacional, objetivando minimizar a ocorrência dessas parasitoses.

Os cuidados com a preparação e a forma de consumo dos alimentos também são factores que podem proteger ou propiciar a proliferação das parasitoses, pois a manipulação incorreta dos alimentos pode estar diretamente relacionadas às parasitoses intestinais (Silva *et al.*, 2005; Nolla & Cantos, 2005). Segundo Soares e Cantos (2005), as hortaliças são amplamente comercializadas e

consumidas no Brasil, sendo este factor um importante meio de transmissão de enteroparasitas. Os autores alertam para o facto de que estes alimentos consumidos *in natura* são determinantes de doenças parasitárias quando cultivados em áreas contaminadas com dejectos fecais ou irrigados com águas poluídas. Na população estudada, 84,2% referiu fazer uso de legumes e verduras, porém o resultado obtido não mostrou significância estatística em relação à presença dos enteroparasitas, embora seja um dos factores predisponentes às enteroparasitoses. A utilização dos vegetais na alimentação é sempre estimulada para o bom desenvolvimento físico e mental das crianças destacando-se a necessidade de orientação da população sobre as boas condições higiênicas para a preparação dos mesmos, junto com a cozedura adequada. (Heller *et al.*, 2004; Traviezo-Valles *et al.*, 2004)

Neves (2000a) alerta para que os enteroparasitas podem circular indiferentemente entre humanos e animais, ou seja, ambos funcionam como hospedeiros ressaltando a importância de se atentar para os animais domésticos tais como cão, gato e outros. Esses animais domésticos estão presentes nas residências, tanto para distração como protecção da família, e constituem factores preponderantes na disseminação das parasitoses. Da população estudada, apenas 5,2% referiram presença de animal doméstico convivendo directamente no mesmo ambiente. Esse resultado não apresentou relação estatisticamente significativa com as enteroparasitoses encontradas, provavelmente por a grande maioria (94,8%) dos entrevistados não possuírem animal doméstico nas suas residências. Faleiros *et al.* (2004), ao contrário dos resultados do presente estudo, encontraram a presença do hospedeiro intermediário (cão) nas residências de 84,3% das crianças contaminadas. Da mesma forma, Florêncio (1990) ao pesquisar 60 famílias em relação a alguns aspectos da epidemiologia de *G. duodenalis*, procurando relacioná-los com a presença de cão domiciliado, observou uma prevalência de infecção de 40%, 20,5% e 11,6%, respectivamente, nas famílias, nas crianças e nos cães. O autor, diante desses resultados, considerou ainda que uma maioria significativa de famílias infectadas pelo parasita não destinava um local reservado para seus cães evacuarem, e que a maior porção das crianças com *Giardia* mantinha contacto com o cão

também parasitado. O referido autor ainda procurou chamar a atenção para o facto de que os cães domésticos podem circular livremente pelas ruas adjacentes às suas casas ficando vulneráveis à contaminação com *Giardia* através da ingestão de água e alimentos fora do domicílio, podendo também carregar quistos desse parasita em seus pêlos, tomando-se fontes de contaminação para seus donos, principalmente as crianças.

A disseminação das enteroparasitoses também pode ocorrer através do contato interpessoal com outras pessoas contaminadas que moram na mesma residência. Crianças frequentadoras de creches, assim como as pessoas que lá trabalham, apresentam altas taxas (17 a 47%) de infecção por *Giardia*, manifestada de forma clínica ou subclínica (Steketee *et al.*, 1989). Sabe-se que quando uma criança apresenta giardíase, há 5 a 25% de chance de um ou mais membros da família estarem contaminados (Steketee *et al.*, 1989; Wharton *et al.*, 1990). Nesse sentido, Otto *et al.* (1998) demonstraram a presença de protozários e helmintas num estudo coproparasitológico realizado em 40 grupos familiares sendo que 35 famílias apresentaram infecção parasitária e nove apresentaram três ou mais elementos do grupo familiar parasitados. Costa-Macedo *et al.* (1999) demonstraram infecção com carga parasitária moderada a elevada em cerca de 38% das crianças e 36% das mães, reforçando a importância da investigação parasitária na população materno-infantil uma vez que o parasitismo acomete não só a criança, mas também os familiares. Resultado semelhante foi apresentado por Costa-Macedo e Rey (2000) que observaram a simultaneidade de parasitismo entre mãe e filho e, esta situação mostrou um risco 1,7 vezes maior para o filho da mulher parasitada de apresentar também doença.

Ainda que neste estudo não se tenha tido a preocupação de conhecer a prevalência de contaminação por enteroparasitas nas famílias das crianças, nas mães ou nos responsáveis, foram realizados exames coprológicos em 18 filhos de funcionários da creche que não estavam matriculados na creche. Destes, 38,8% (7/18) estavam infectados com enteroparasitas. Ressaltamos que 38,8% (7/18) dos funcionários encontravam-se infectados com parasitas intestinais e que

albergavam parasitas em comum ao de seus filhos tais como *Cryptosporidium* spp., *G. duodenalis* e *E. histolytica*, podendo então contribuir para a transmissão na creche e familiares.

As protozooses e as helmintoses são doenças de manifestação espectral, variando desde casos assintomáticos à leves. Nos casos leves, os sintomas são inespecíficos, tais como anorexia, irritabilidade, distúrbios do sono, náuseas, vômitos ocasionais, dor abdominal e diarreia. Os quadros graves podem ocorrer em doentes com maior carga parasitária e em imunodeprimidos e desnutridos. O aparecimento ou agravamento da desnutrição ocorre através de vários mecanismos, tais como, lesão da mucosa (*G. duodenalis*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, coccídios), alteração do metabolismo de sais biliares (*G. duodenalis*), competição alimentar (*A. lumbricoides*), exsudação intestinal (*G. duodenalis*, *S. stercoralis*, *N. americanus*, *T. trichiura*), favorecimento de proliferação bacteriana (*E. histolytica*) e hemorragias (*N. americanus*, *T. trichiura*) (Melo *et al.*, 2004). No presente estudo, 69,8% dos 43 participantes infectados afirmaram não apresentar sintomas, concordando com resultados apresentados por outros autores (Santos *et al.*, 2008). Dentre os sintomáticos monoparasitados, o sintoma mais prevalente foi vômito (71,4%), seguido de diarreia 57,1%. Enquanto que, nos poliparasitados, diarreia e dor abdominal (50% cada), foram os mais prevalentes. Quando foram analisados a prevalência de sintomas nos doentes com criptosporidiose e giardíase, nos monoparasitados prevaleceram os casos assintomáticos (81,2% e 78,6%, respectivamente) em relação aos sintomáticos. Nos casos de monoparasitismo tanto por *Cryptosporidium* spp. Como por *G. duodenalis* os sintomas mais prevalentes foram diarreia e vômito 66,6% cada. Entretanto, nos poliparasitados, os casos sintomáticos foram mais evidentes (75% *Cryptosporidium* spp. e 60% *G. duodenalis*), tal facto deve-se a possível associação com outros enteroparasitas que em associação debilitam o sistema imunológico do doente. A infecção por *Cryptosporidium* spp. está frequentemente associada com episódios diarreicos, persistentes, com duração variável (Newman *et al.*, 1999). Andrade, *et al.*, (2008) em seus estudos, em um centro de educação infantil público (Blumenau-SC, Brasil), obtiveram uma prevalência de 7,6% de *Cryptosporidium* spp. e relataram que 14% dos entrevistados afirmaram que seus filhos

apresentavam episódios de diarreia. Nascimento *et al.*, (2009) pesquisando presença de *Cryptosporidium* spp. em crianças, em uma creche pública (Recife-PE, Brasil), obtiveram uma prevalência de 32% para *Cryptosporidium* spp. e dos entrevistados 48,8% relataram apresentar casos de diarreia.

O espectro da giardíase é extenso, desde infecções assintomáticas até infecções com diarreia crônica acompanhada de esteatorreia, perda de peso e má absorção intestinal, que podem ocorrer em 30 a 50% das pessoas infectadas (Neves, 2005). A forma aguda caracteriza-se por diarreia do tipo aquosa, explosiva, acompanhada de distensão e dor abdominal. A giardíase pode levar à má absorção de açúcares, gorduras e vitaminas A, D, E, K, B12, ácido fólico, ferro e zinco (Melo *et al.*, 2004). Em crianças, principalmente, pode surgir intolerância à lactose devido à perda da actividade enzimática na mucosa do intestino delgado (Teo, 2002).

A diversidade de parasitoses exige tratamento com medicamentos específicos, sendo desaconselhável o uso de fármacos sem a determinação do agente etiológico. Os exames de detecção de parasitas intestinais devem ser específicos para diminuir os riscos de reincidências devido à resistência dos parasitas aos anti-helmínticos e anti-protozoários (Barnabé *et al.*, 2008).

O uso de fármacos antiparasitários entre os entrevistados (50%), conforme evidenciaram os relatos deste estudo, pode ter contribuído na maior prevalência (54,2%) de participantes não parasitados, embora não tenha tido significado estatístico. Porém, segundo Andrade *et al.* 2010, o tratamento das parasitoses intestinais consiste, além do emprego de antiparasitários, em medidas de educação preventiva e de saneamento básico. Em vista da dificuldade de diagnóstico específico das parasitoses, muitas vezes, são realizados tratamentos empíricos com mais de um fármaco. Dentre os entrevistados que afirmaram ter usado algum tipo de medicação antiparasitária, nos últimos dois meses, antes deste estudo, 36,2% encontravam-se parasitados. Dentre os fármacos, Mebendazol (72,3%) foi o mais relatado, seguido de Albendazol (23,5%). A baixa prevalência de helmintas (18,6%) no presente estudo pode ser justificado pela maior utilização do Mebendazol entre os entrevistados, embora não se tenha verificado diferenças estatisticamente significativas. Tal



fármaco, apresenta eficácia clínica entre 93,8-100% para os Nemátodeos: ascaridíase, ancilostomíase, tricuriase e enterobíase (Upcroft & Upcroft, 2001), porém, não apresenta eficácia para protozoários intestinais. O tratamento das protozooses intestinais (giardíase e amebíase) tem sido feito com os derivados nitroimidazólicos: metronidazol, tinidazol ou secnidazol. O metronidazol, pelo seu baixo custo e por integrar a cesta básica de medicamentos do Sistema Único de Saúde (SUS), tem sido o fármaco mais utilizado no Brasil. Possui o inconveniente de exigir o tratamento por sete dias e apresentar efeitos colaterais, como cefaleia, vertigem, náuseas e gosto metálico. O secnidazol é dado usualmente em dose única para adultos e crianças. O seu efeito é rápido sendo completamente absorvido, com meia-vida de 17 a 29 horas, mais longa em relação aos derivados imidazólicos. Náuseas, dor abdominal, sabor metálico e anorexia foram relatados, mas normalmente não exigem descontinuação do fármaco (Gardner & Hill, 2001). Taxas de resistência clínica em torno de 20% foram relatadas com o uso de metronidazol no tratamento da giardíase e taxas de recorrência em torno de 90%. Resistência cruzada ao tinidazol foi demonstrada com estirpes de *G. duodenalis* resistentes ao metronidazol. Como alternativa a este, o albendazol pode ser usado no tratamento da giardíase (Upcroft & Upcroft, 2001). Um estudo em larga escala em Bangladesh mostrou a eficácia média, do albendazol, de 62 a 95%, comparado com 97% para o metronidazol (Hall & Nahar, 1993). Estes altos níveis de eficácia são atingidos utilizando-se mais de uma dose. Isto pode contribuir para a resistência ao albendazol, tal como verificam alguns autores (Upcroft & Upcroft, 2001).

O tratamento da criptosporidiose é essencialmente sintomático e visa aliviar os efeitos da diarreia e desidratação. Em imunocompetentes geralmente ocorre cura espontânea. A maioria dos fármacos testados não apresenta eficácia específica comprovada e consistente contra a criptosporidiose. Em imunodeficientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (Sida) o tratamento anti-retroviral específico para o vírus da imunodeficiência humana (VIH) foi responsável por uma redução de 90% na incidência da criptosporidiose nos Estados Unidos da América (EUA). Estudos recentes têm demonstrado que a nitazoxanida possui eficácia comprovada

no tratamento da criptosporidiose em crianças e adultos imunocompetentes. Estudos preliminares mostraram que o fármaco poderia também ser utilizado para o tratamento de pacientes com sida e criptosporidiose. A nitazoxanida é o primeiro fármaco a ser autorizado para o tratamento de criptosporidiose nos EUA (Neves, 2005).

Os principais fármacos usados no tratamento dos nemátodes intestinais (*A. lumbricoides*, *S. stercoralis*, *Ancilostomídeos*, *Enterobius vermicularis* e *T. trichiura*) são: mebendazol e albendazol. A cura completa para estas infecções não é atingida com qualquer um destes fármacos (Geerts & Gryseels, 2000). O mebendazol é um derivado benzimidazólico de amplo espectro, com pouca absorção. Tem actividade ovicida, porém não é larvicida. Geralmente tem poucos efeitos colaterais, tais como: dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, constipação, prurido, vertigem. Reações alérgicas são raras. Apresenta taxas de cura para ascaridíase entre 93,8% e 100% e taxas de redução de ovos de 97,9% a 99,5% (Neves, 2005). O albendazol é outro derivado benzimidazólico com amplo espectro antiparasitário, sendo pouco absorvido. Portanto, a sua acção ocorre directamente no aparelho gastrointestinal, utilizado-se em dose única para adultos e crianças acima de dois anos. Este fármaco possui acção vermícida, larvicida e ovicida. Na ascaridíase e enterobíase, este fármaco mostra níveis de cura e de redução de ovos de até 96,4%. Os efeitos colaterais são pouco frequentes, entre eles: tonturas, náuseas, vômitos e dores abdominais (Neves, 2005).

Várias investigações demonstram que as condições nutricionais e a presença de parasitas intestinais em crianças se correlacionam intensamente, uma vez que uma elevada carga parasitária no intestino pode ocasionar redução na entrada de nutrientes e absorção intestinal, aumento do catabolismo e sequestro de nutrientes requeridos para a síntese e crescimento tecidual. (Stephenson, 1980; Anonymous, 1983; Muniz-Junqueira; Ferreira *et al.*, 1991; Queiroz; 2002).

A análise dos dados antropométricos dos parasitados desta pesquisa revelou que a maioria deles apresentaram-se no peso normal (39%) e que obesidade (33%) e excesso de peso (26%) prevaleceram sobre a desnutrição (6%). Resultados semelhantes foram observados em um estudo realizado por Biscegli *et al.* (2009) em uma creche localizada na cidade de Catanduva (São Paulo -

Brasil) que evidenciaram a obesidade (8; 6%) prevalecer sobre a desnutrição (3; 2,2%). Outro estudo, publicado em 2008 e realizado com crianças de creche de um município do Rio de Janeiro, também mostrou reflexos da transição nutricional (Santos & Leão, 2008). Resultados diferentes foram obtidos em um estudo de 2005, desenvolvido em creches beneficentes do município de São Paulo, que demonstrou prevalência similar de desnutrição (7,4%) e obesidade (6,3%) (Machado *et al.*, 2005). Apesar de a prevalência de cryptosporíase e giardíase ter sido elevada, os dados mostram que não houve prejuízo do estado nutricional das crianças estudadas (apenas 6% de desnutrição).

Nos últimos 30 anos, observa-se mudança nos padrões nutricionais da população brasileira (transição nutricional), com diminuição evidente de desnutridos e aumento da frequência de indivíduos com excesso de peso ou obesidade, principalmente devido aos hábitos alimentares inadequados. Em agosto de 2010, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgou que na população brasileira o excesso de peso já atinge metade da população adulta; uma em cada três crianças (de 5 a 9 anos); e um quinto dos adolescentes no País. Este facto já é motivo de preocupação em nível de Saúde Pública, pois a presença de obesidade leva a um aumento das taxas de morbidade e de doenças crônicas como diabetes, problemas cardiovasculares, ortopédicos e distúrbios psicológicos e sociais (Biscegli *et al.*, 2006).

## 8. CONCLUSÃO

As parasitoses intestinais representam um problema de saúde pública mundial e são responsáveis pelos altos índices de morbidade observados em países nos quais o crescimento populacional não é acompanhado da melhoria nas condições de vida (Ferreira *et al.*, 2000). A transmissão das enteroparasitoses depende da presença de indivíduos infectados, deficiência sanitária e, principalmente, condições socio-económicas e culturais da população (Marzochi *et al.*, 1978). Com a competitividade no mercado de trabalho e a maior necessidade de as mães regressarem cada vez mais cedo às actividades profissionais, há uma crescente busca do atendimento à criança em creches públicas e/ou privadas. Esta prática, que tem vindo a ocorrer cada vez mais cedo, tem benefícios mas, também, apresenta riscos para a saúde das crianças. Vários estudos têm demonstrado que a frequência à creche é factor de risco para a saúde, uma vez que aumenta a exposição e a transmissão de agentes patogénicos, dentre eles os parasitas intestinais (Berg *et al.*, 1991; Fuchs *et al.*, 1996). Os resultados obtidos permitiram várias conclusões listadas a seguir:

- A elevada taxa de infecção por protozoários encontrada nesta população vinculada à creche, revela a necessidade da adopção de medidas educativas permanentes dirigidas às crianças e aos funcionários. Sugere-se, aos directores da creche, a promoção de palestras para funcionários e responsáveis pelas crianças, nas quais sejam apresentadas as formas de prevenção de parasitoses. Também, instruir os educadores na promoção de brincadeiras instrutivas com intuito de despertar a educação sanitária nestas crianças; não utilizarem a prática de medicação em massa nas crianças da creche, pois dessa forma podem estar contribuindo para a resistência de parasitas aos fármacos; trocar a areia utilizada no parque de recreações pelo menos uma vez por ano. Às autoridades competentes, sugere-se efectuarem obras de saneamento básico, urbanização e habitação na

comunidade, a fim de melhorar as condições de vida desses indivíduos; efectuarem a vermifugação e vacinação de cães e gatos uma vez que estes podem estar contaminados e serem fontes de infecção; averiguar a qualidade da água da rede pública e subterrânea (poços) desta comunidade, afim de certificar-se da ausência de agentes patogénicos.

- Pode-se concluir que, em nosso meio, *Cryptosporidium* tem papel etiológico importante e que métodos adequados para seu diagnóstico devem ser implementados a nível dos laboratórios de patologia clínica.

- A faixa etária compreendida ente 3-6 anos de idade foi a que obteve maior prevalência de parasitas intestinais, idade esta na qual, as crianças estão mais susceptíveis às infecções e influências ambientais devido às modificações comportamentais.

- A presença de *G. duodenalis* associada à idade, observada neste trabalho, pode estar relacionada ao aumento na transmissão fecal-oral de patógenos bem como à presença de hábitos higiénicos precários observados nesta faixa etária.

- Os funcionários da creche podem estar implicados na transmissão e manutenção de parasitoses intestinais nesta instituição e entre os familiares, pelo que, quando se faz a desparasitação das crianças esse tratamento deve ser extensivo aos familiares directos e aos funcionários da creche.

- A presença de hospedeiros intermediários tais como cães e gatos nas residências não foi significativa em relação às parasitoses encontradas, porém o facto de encontrar doentes parasitados com *C. parvum* pode estar relacionado a transmissão zoonótica, sendo necessário mais estudos àcerca do assunto nesta comunidade.

- O facto da água para consumo da creche e da maioria das residências dos entrevistados ser de rede de abastecimento público poderá ter baixado a percentagem de casos de parasitados.

- Os dejectos fecais na maioria das residências eram despejados através de esgotos céu aberto na comunidade, sendo um afonte de contaminação do ambiente em que circulam pessoas de todas as idades e animais.
- A utilização de fármacos antiparasitários, como medida profilática, pode ter influenciado os resultados encontrados, um menor número de helmintoses intestinais na população estudada.
- A obesidade e o excesso de peso, entre os parasitados, demonstraram ser, actualmente, um factor a considerar como predisponente às infecções por parasitas intestinais patogénicos, tendo-se, paralelamente, observado uma baixa taxa de desnutrição nas crianças estudadas.
- A alta prevalência de amostras positivas para *C. parvum* comprovam que creches são ambientes propícios a essa ocorrência devido ao contacto entre as crianças e funcionários que são muitas vezes mal orientados quanto às medidas de higiene e manipulação de alimentos. A maior via de infecção por *Cryptosporidium* spp. é a transmissão interpessoal, que é bem ilustrada em creches.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 14:447-475.
- APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C.A., OLSON, M.E., 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - current status and future needs. *Trends in Parasitology*. 21:370-376.
- AYDIN, A.F., BESIRBELLIOGLU, B.A., AVEI, I.Y., TANVUKSEL M., ARAZ, E., PAHSA A., 2004. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 50:147-151.
- ALMEIDA, A.A., DELGADO, M.L., SOARES, S.C., CASTRO, A.O., MOREIRA M.J., MOREIRA, M.J., MENDONÇA, C.M., CANADA, N.B., Da COSTA, J.M., 2006. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53:177-178.
- ANDRADE, F., RODE, G., FILHO, H.H.S., GOULART, J.A.G., 2008. Parasitoses intestinais em um centro de educação infantil público do município de Blumenau (SC), Brasil, com ênfase em *Cryptosporidium spp* e outros protozoários. *Revista de Patologia Tropical*. 37:332-340.
- ARMENGOL, C.P. *et al.* 1997. Epidemiologia del parasitismo intestinal infantil en el valle del Guadalquivir, España. *Revista Espanhola Salud Publica*, 71: 547-552.
- BARÇANTE, T.A., CAVALCANTI, D.V., SILVA, G.A.V., LOPES, P.B., BARROS, R.F., RIBEIRO, G.P., NAUBERT, L.F., BARÇANTE, J.M.P., 2008. Enteroparasitos em crianças matriculadas em creches públicas do município de Vespasiano, Minas Gerais. *Revista de Patologia Tropical*, 37:33-42.
- BARROS, A.J., ROSS, D.A., FONSECA, W.V., WILLIAMS, L.A., MOREIRA-FILHO, D.C., 1999. Preventing acute respiratory infections and diarrhoea in child care centers. *Acta Paediatrica*. 88:1113-1118.
- BATISTA-FILHO M., RISSIN A., 2009. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Caderno de Saude Publica*. 9:181-191.
- BISCEGLI T.S., CORRÊA C.E., ROMERA J., HERNANDEZ J.L., 2006. Nutritional status and prevalence of iron deficiency in children enrolled in a day care center. *Revista Paulista de Pediatria*, 24:323-329.
- BECK, C. *et al.* (2005). Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunster, 1882) em cães (*Canis familiares*) avaliada pelo método de Faust e Cols (1939) e pela coloração de Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. *Ciências Rural*, 35:126-130.
- BERG, A.T., SHAPIRO, E.D., CAPOBIANCO, L.A., 1991. Group day care and the risk of serious infections 1. illnesses. *American Journal of Epidemiology*, 133:154-163.

- BEZERRA, F.S.M., *et al.*, 2003. Incidência de parasitos intestinais em material sub-ungueal e fecal em crianças de Creche Aprisco - Fortaleza, CE. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 35:39-40.
- BÓRQUEZ, C., *et al.*, 2004. Enteroparasitosis en niños escolares del valle de Lluta. Arica - Chile. *Parasitologia Latinoamericana*, 59:175-178.
- CACCIÒ, S.M., de GIACOMO, M. e POZIO, E., 2002. Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal Parasitology*, 32: 1023-1030.
- CACCIÒ, S.M., THOMPSON, R.C., McLAUCHLIN, J. e SMITH, H.V., 2005. Unravelling Cryptosporidium and Giardia epidemiology. *Trend in Parasitology*, 21: 430-437.
- CARDOSO, G.S., SANTANA, A.D.C., AGUIAR, C.P., 1995. Prevalência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches do município de Aracaju, SE, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 8:25-31.
- CARLI, G. *et al.*, 1989. Estudo de enteroparasitoses e das condições sócio econômicas e sanitárias das vilas periféricas de Porto Alegre, RS, Brasil, durante o período de 1965 a 1981. *Caderno de Farmacologia*, 5:73-92.
- CARVALHO, T.B., CARVALHO, L.R. & MASCARINI, L.M., 2006. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium sp.*, *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo*, 48:269-273.
- CARNEIRO, F.F. *et al.*, 2002. The risk of *Ascaris lumbricoides* infection in children as an environmental health indicator to guide preventive activities in Caparaó and Alto Caparaó, Brazil. *Bulletin of the World Health Organization*, 80:40-46.
- COELHO, J.C.V., 1975. Incidência de enteroparasitas em alunos do grupo escolar “Dr. Oswaldo Cruz”, Curitiba, Paraná. *Acta Biológica Paranaense*. 4:3-12.
- CORDELL, R.L., ADISS, D.G., 1994. Cryptosporidiosis in child care settings. *Paediatric Infectious Disease Journal*. 13:310-317.
- COSTA-MACEDO, L.M., COSTA, M.C.E., ALMEIDA, L.M., 1999. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* em crianças menores de dois anos: estudo populacional em comunidade do Estado do Rio de Janeiro. *Caderno de Saúde Pública*, 15:173-178.
- COSTAMAGNA, S.R., *et al.*, 2005. Parásitos en aguas del arroyo Naposta, aguas de recreación y de consumo en la ciudad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Parasitologia Latinoamericana*, 60:122-126.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T., 2000. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 321-54.



- CRAUN, G.F.; HUBBS, S.A.; FROST, F.; CALDERON, R.L; VIA, S.H. 1998. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Journal Awwa*, 9:81-91.
- CHAVES, E.M.S., VAZQUEZ, L., LOPES, K., FLORES, J., OLIVEIRA, L., RIZZI, L., FARES, E.Y., QUEROL, M., 2006. Levantamento de Protozoonoses e Verminoses nas sete creches municipais de Uruguaiana, Rio Grande do Sul - Brasil. *Revista Brasileira Análises Clínicas*, 38:39-41.
- CHAN, M.S., 1997. The global burden of intestinal nematode infections – *The Korean Journal of Parasitology*, 13:438-443.
- DYKSEN, J.E.; MARSHALL, M.M.; GERA, A.; CLANCY J.L., 1998. Cost of advanced UV for inactivating Crypto. *Journal of the American Water Works Association*, 90:103-111.
- EVANGELISTA, K.M.D., SANTOS, M.A., 2000. Prevalência dos parasitos intestinais em Goiânia. *Revista de Patologia Tropical*, 1:51-61.
- ERLANDSEN, S.L., BEMRICK, W.J., 1987. Evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *Journal of Parasitology*, 73:623-629.
- ERLANDSEN, S.L., BEMRICK, W.J., WELLS, C.L., FEELY, D.E., KNUDSON, L., CAMPBELL, S.R., VAN KULEN, H., JAROLL, E.L., 1990a. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from great blue heron (*Ardea herodias*). *Journal of Parasitology*. 76:717-724.
- EY, P.L., MANSOURI, M., KULDA, J., NOHÝNKOVÁ, E., MONIS, P.T., ANDREWS, R.H., MAYRHOFER, G., 1997. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44:626-635.
- FAUBERT, G., 1988. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13:35-54.
- FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C.; PELLIZARI, V.H. 2002. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in war sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. *Jounal Microbiology*, 33:41-43.
- FALEIROS, J.M.M., *et al.*, 2004. Ocorrência de enteroparasitoses em alunos de escola pública de ensino fundamental do município de Catanduva (São Paulo, Brasil). *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 63:243-247.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; AND UPTON, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. *International Journal for Parasitology*, 30:1305-1322
- FUCHS, S.C., MAYNART, R.C., COSTA, L.F., CARDOZO, A., SCHIERHOLT, R., 1996. Duration of day-care attendance and acute respiratory infection. *Caderno Saúde Pública*, 12:291-296.

- FERREIRA, U. M.; FERREIRA, C. S.; MONTEIRO, C. A., 2000. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Revista Saúde Pública*, São Paulo, 34:73-82.
- FEELY, D.E., 1988. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *Journal Protozoology*, 35:52-4.
- FLORENCIO, M.L.Q., 1990. Estudos de alguns aspectos epidemiológicos da Giardíase em famílias de cidade de Pradópolis, São Paulo. *Journal Pediatr*, 66:83-90.
- FURNESS, B.W., BEACH, M.J., ROBERTS, J.M., 2000. Giardiasis surveillance - United States, 1992-1997. *Morb Mortal Wkly Rep journal*. 49:1-13.
- GALANEW, T., LALLE, M., HAILU, A., POZIO, E., CACCIO, S.M., 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Tropica*, 102:92-99.
- GAMBA, R.C.; CIAPINA, E.M.P; ESPINDOLA, R.S. PACHECO, A.; PELLIZARI, V.H. 2000. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo, Brazil. *Brasilian Journal Microbiology*, 31:151-153.
- GARDNER, T.B., HILL, D.R., 2001. Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:114-28.
- GEERTS, S., GRYSEELS, B., 2000. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clinical Microbiology Reviews*, 13:207-22.
- GENNARI-CARDOSO M.L.; COSTA-CRUZ J.M; CASTRO E.; LIMA L.M.F.S., 1996. *Cryptosporidium* sp in children suffering from acute diarrhea at Uberlândia city, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:551-554.
- GURGEL, R.C., CARDOSO, R.C., SILVA, A.M., SANTOS, L.N., OLIVEIRA R.C.V., 2005. Creche: ambiente expositor ou protetor nas infestações por parasitas intestinais em Aracaju, SE. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38:80-86.
- GUIMARÃES, S., SOGAYAR, M.I.L., 1995. Guimarães S, Sogayar MIL. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo state, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 37:501-506.
- HAQUE, R., ROY, S., KABIR, M., STROUP, S.E., MONRAL, D., HOUP, E.R., 2005. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *The Journal of Infectious Diseases*. 192:2171-2173.
- HALL, A., NAHAR, Q., 1993. Albendazole as a treatment for infections with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87:84-6.
- HELLER, L. *et al.*, 2004. Os cistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos de saúde humana. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 13:79-92.
- HEITMAN, T.L., FREDERICK, L.M., VISTE, J.R., GUSELLE, N.J., MORGAN, U.M., THOMPSON, R.C., OLSON, M.E., 2002b. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and

- characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 48:530-541.
- HOQUE, M.E., HOPE, V.T., SCRAGG, R., 2002b. *Giardia* infection in Auckland and New Zealand: trends and international comparison. *NZ Medical Journal*, 115:121-123.
- HOMAN, W.L, VAN ENCKEVORT, F.H., LIMPER, L., VAN EYS, G.J., SCHOONE, G.J., KASPRZAK, W., MAJEWSKA, A.C., VAN KNAPEN, F., 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitology research*, 78:316-323.
- HOMAN, W.L, MANK, T.G., 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *International journal for parasitology*, 31:822-826.
- HONIBERG, B.M., BALAMUTH, W., BOVEE, E.C., CORLISS, J.O., GOJDICS, M., HALL, R.P., KUDOUDO, R.R., LEVINE, N.D., LOEBLICH, A.R., WEISER, J., ENRICH, D.H., 1964. A revised classification of the Phylum Protozoa. *Journal Protozoology*, 11:7-20.
- HOPKINS, R.M., MELONI, B.P., GROTH, D.M., WETHERALL, J.D., REYNOLDS, J.A., 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *Journal Protozoology*, 83:44-51.
- HUGGINS, D., FARIAS, S.M., MELO, E.T., 1985. "Como diagnosticar e tratar": Parasitoses intestinais. *Revista Brasileira Medicina*, 42:98-119.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE), 2000. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico.
- JAKUBOWSKI, W., GRAUN, G.F., 2002. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: OLSON, B.E., OLSON, M.E., WALLIS, P.M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. Wallingford, UK, CAB International, 217-238.
- JAMES K., TUMWINE, A.D.D.Y., KEKITIINWA, N.N., DONNA E.A, STEPHEN M. R., GIOVANNI W., XIAO C.F., SAUL T, 2003. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago hospital, Kampala, Uganda. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68:710-715.
- LALLE, M., POZIO, E., CAPELLI, G., BRUSCHI, F., CROTTI, D., CACCIO S.M., 2005a. Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal Parasitology*; 35:207-213.
- LANE, S., LLOYD, D., 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 28:371-409.
- LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH III, A. R.; LOM, J.; LYNN, D. H.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J. ; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the Protozoa. *Journal Protozoology*, 27(1):37-58, 1980.

- LOUREIRO, E.C., LINHARES, A.C., MATA, L., 1989. Criptosporidiose em crianças de 1 a 2 anos de idade, com diarreia aguda em Belém, Pará, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84:117-122.
- LUDWIG, K.M., FREI, F., FILHO, F.A., RIBEIRO-PAES, J.T., 1999. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 547-555.
- MACHADO, R.C., MARCARI, E.L, CRISTIANE, S.F.V., CARARETO, C.M.A., 1999. Giardíase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32:1-12.
- MACHADO, R.L.D., *et al.*, 2001. Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34:50-62.
- MACHADO E.H., BRASIL A.L., PALMA D., TADDEI J.A., 2005. Nutritional condition and prevalence of anemia in children enrolled in daycare centers. *Revista Paulista de Pediatria*. 23:21-26.
- MACLER, B.A.; MERCKLE, J.C., 2000. Current Knowledge on groundwater microbial pathogens and their control. *Hidric Journal*, 8:29-40.
- MASCARINI, L.M., DONALÍSIO, M.R., 2006. Giardíase e Criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39:577-579.
- MARZOCHI, M.C.A. & CARVALHEIRO, J.R., 1978. Estudos dos fatores envolvidos na disseminação dos enteroparasitas. Distribuição de algumas enteroparasitoses em dois grupos populacionais da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. *Revista Instituto Medicina Tropical*, São Paulo, 20:31-35.
- MAYRHOFFER, G., ANDREWS, R.H., EY, P.L., CHILTON, N.B., 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Journal Parasitology*, 111:11-17.
- MBIKO NCHITO, PAUL KELLY, SANDIE SIANONGO, NKANDU P. LUO, ROGER FELDMAN, MICHAEL FARTHING, AND K. SRI BABOO., 1998. Cryptosporidiosis in urban Zambian children: an analysis of risk factors. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 59:435-437.
- MEDEIROS M.I.C; NEME S.N.; SILVA P.; CAPUANO D.M.; ERRERA M.C.; FERNANDES A.S.; VALLE G.R.; AVILA F.A., 2001. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 43:21-24.
- MELO, M.C.B., KLEM, V.G.Q., MOTA, J.A.C., PENNA, F.J., 2004. Parasitoses intestinais. *Revista Medica Minas Gerais*. 14:3-12.

- MELLO, A.L.V., BOHLAND, A.K., 1999. Parasitoses intestinais em uma amostra de escolares do povoado Santana dos Frades, Pacatuba-SE. *Revista Brasileira Análises Clínicas*, 31:41-43.
- MENDONZA, D. et al. (2001). Parasitosis intestinales en 4 círculos infantiles de San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana, 1998. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 53:189-193.
- MEYER, E.A., 1990. *Giardiasis: human parasitic diseases* (vol.3). Elsevier Science, Amsterdam, 368p.
- MOURA, R.A., WADA, C.S., PURCHIO, A., ALMEIDA, T.V., 2006. *Técnicas de laboratório* (3ª ed.). Ed. Atheneu, São Paulo.
- MONIS, P.T., ANDREWS, R.H., MAYRHOFER, G., HOMAN, W.L., LIMPER, L., EY, P.L., 1996. Molecular genetic analyses of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase gene. *Journal Parasitology*, 112:1-12.
- MONIS, P.T., ANDREWS, R.H., 1998. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. *International Journal Parasitology*, 28:981-987.
- MONIS, P.T., ANDREWS, R.H., MAYRHOFER, G., HOMAN, W.L., LIMPER, L., EY, P.L., 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analyses of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology*, 116:7-19.
- MONIS, P.T., ANDREWS, R.H., MAYRHOFER, G., EY, P.L., 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16:1135-1144.
- MONIS, P.T., ANDREWS, R.H., MAYRHOFER, G., EY, P.L., 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology end Evolution*, 16:1135-1144.
- MONIS, P.T., CACCIO, S.M., THOMPSON, R.C.A., 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitology*, 25:93-100.
- MORRISON, H.G., MC ARTHUR, A.G., GILLIN, F.D., ALEY, S.B., ADAM, R.D., OLSEN, G.J., BEST, A.A., CANDE, W.Z., CHEN, F., CIPRIANO, M.J., DAVIDS, B.J., DAWSON, S.C., ELMENDORF, G., NIGAM, A., NIXON, J.E, PALM, D., PASSAMANECK, N.E., PRABHU, A., REICH, C.I., REINER, D.S., SAMUELSON, J., SVARD, S.G., SOGIN, M.L., 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317:1921-1926.
- MULLER, A.P.B., 2000. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NASCIMENTO, W.R.C.; CAVALCANTI, I.M.F.; IRMÃO, J.I.; ROCHA, F.J.S., 2009. Presença de *Cryptosporidium* spp. em crianças com diarreia aguda em uma creche pública de Recife, Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42:175-178.
- NASH, T.E., Mc CUTCHAN, T., KEISTER, D., DAME, J.B., CONRAD, J.D., GILLIN, F.D., 1985. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *Journal Infections Disease*. 152:64-73.

- NEVES, D.P., 2005. *Parasitologia Humana*. 11<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu. 494p.
- NEWMAN, R.D., SEARS C.L., MOORE S.R., NATARO, J.P, WUHIB, T., AGNEW D.A., GUERRANT, R.L, LIMA, A.A.M., 1999. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases* 180:167-175.
- NEVES, D.P. 2000a. Glossário. In: \_\_\_\_\_. *Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, cap.1, p.2.
- NETO R.C., 2004. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. *Tese de Mestrado*. Universidade de Campinas (UNICAMP).
- NUNES, M.P.O., *et al.*, 1997. Ocorrência de parasitoses intestinais em crianças da creche “Lar Menino Jesus”, Natal – RN. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 29:195-196.
- NUÑEZ, GONZALEZ, O.M.; GONZALEZ, I., 2003. Factores de riesgo de la infección por *Giardia lamblia* em niños de guarderías infantiles de ciudad de La Habana, Cuba. *Caderno Saúde Pública*, 19:677-682.
- NUNEZ F.A.; GONZALEZ, O.M.; GONZALEZ, I.; ESCOBEDO, A.A.; CORDOVI R.A., 2003. Intestinal Coccidia in Cuban Pediatric Patients with Diarrhea. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 98: 539-542.
- NOLLA, A.C., CANTOS, G.A., 2005. Prevalência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos, Florianópolis, SC. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 38:542-525.
- OLIVERIRA, T.B., *et al.* 1979. Enteroparasitoses observadas em crianças que freqüentam uma creche de Ribeirão Preto. *Medicina*, 10:7-10.
- OTTO, J.P., *et al.*, 1998. Enteroparasitosis en 40 grupos familiares de la localidad de Chauquear, Isla Puluqui, X Region de Chile. *Parasitology*, 22:49-51.
- ORTEGA, Y.R., STERLING, C.R., GILMAN, R.H., CAMA, V.A., DIAZ, F., 1993. Cyclospora species – a new protozoan pathogen of humans. *New England Journal of Medicine*, 328:1308-1312.
- OSHIRO, E.T., DORVAL, M.E.C., NUNES, V.L.B., SILVA, A.A., SAID, L.A.M., 2000. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 33:277-280.
- PAULINO, R.C., CASTRO, E.A., THOMAZ-SOCCOL, V., 2001. Tratamento anaeróbico de esgoto e sua eficiência na redução da viabilidade de ovos de helmintos. *Revista. Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 34:421-428.
- PAULINO, R.C., 2005. Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP. *Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos*. Curitiba.

- PALMER, S.R., 1990. Epidemiological methods in the investigation of food poisoning outbreaks. *Letters in Applied Microbiology*, 11:109-115.
- PRADO, M.S., *et al.* 2001. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 34:99-101.
- QUADROS, R. M., *et al.* (2004). Parasitas intestinais em centros de educação infantil municipal de Lages, SC, Brasil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37: 422-423.
- RÉ, A.L. 1999. Qualidade microbiologica e parasitologica de águas de consumo humano do município de Araras (SP), com ênfase na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia lamblia*. São Paulo. 132p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- READ, C.M., WALTERS, J., ROBERTSON, I.D., THOMPSON, R.C.A., 2002. Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhea. *International Journal Parasitology*, 32:229-231.
- READ, C.M., MONIS, P.T., THOMPSON, R.C., 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 4:125-130.
- REBOUÇAS, A.C., 2002. Água Doce no Mundo e no Brasil. In: REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B. e TUNDISI, J.G. (Org). Águas Doces no Brasil - Capital Ecologico, Uso e Preservação. 2º ed. São Paulo: Editora Escrituras. Cap. 1, p.1-37.
- ROCHA, R.S., *et al.*, 2000. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais em crianças do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 3:431-436.
- ROSE, J.B., 1997. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Public Health*, 18:135-161.
- SALDIVA, S.P., *et al.* 1999. Ascaris, Trichuris association and malnutrition in Brazilians children. *Pediatric Perinatal Epidemiology*, 13: 89-98.
- SANTOS, C.S. *et al.*, 1984. Inquérito parasitológico pelo exame de fezes em crianças pertencentes a creches no Rio de Janeiro. *Journal Pediatric*, 56:97-100.
- SANTOS, L.U., *et al.*, 2004. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brasil. *Revista Instituto Medicina Tropical, São Paulo*, 46:309-313.
- SANTOS A.L, LEÃO L.S., 2008. Anthropometric profile of preschool children of a day care center in Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Paulista Pediatrca*, 26:218-224.
- SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A., 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Disease Initiative". *Trends Parasitology*, 22:203-208.

- SATURNINO, A.C.R.D., *et al.*, 2003. Relação entre a ocorrência de parasitas intestinais e sintomatologia observada em crianças de uma comunidade carente de Cidade Nova, em Natal-Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 35:85-87.
- SCOLARI, C., *et al.*, 2000. Prevalence and distribution of soil-transmitted helminth (STH) infections in urban and indigenous schoolchildren in Ortigueira, State of Paraná, Brasil: implications for control. *Tropical Medicine & International Health*, 5:302-307.
- SCHMIDT, G.D., ROBERTS, L.S., 1981. *Foundations of Parasitology*, (2<sup>a</sup> ed.), St. Louis, The C.V. Mosby Company, 975p.
- SEARCY, K.R; PACKMAN, A.L; ATWILL, E.R.; HARTER, T. 2006. Deposition of *Cryptosporidium* oocysts in streambeds. *Appl. Environment Microbiology*. 3:1810-1816.
- SEMENAS, L., *et al.*, 1999. Monitoreo de parásitos en efluentes domiciliarios. *Revista Saúde Pública*, 33:379-381.
- STEKETEE, R.W., REID, S., CHENG, T., STOEBIG, J.S., HARRINGTON, R.G., DAVIS, J.P., 1989. Recurrent outbreaks of giardiasis in a child day care center, Wisconsin. *American Journal of Public Health*; 79:485-90.
- SOARES, B., CANTOS, G.A., 2005. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira Epidemiologia*, 8:377-384.
- SILVA, J.O., *et al.*, 2005. Enteroparasitose e oncomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista Brasileira Epidemiologia*, 8:385-392.
- SILVA S.; SILVA S.P; GOUVEIA Y.S.; SILVA N.O.; MELO M.E.R.M.; MOURA H., NEVES R.H.; BELLO A.R.; MACHADO-SILVA J.R., 2003. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp em amostras fecais de crianças, menores de 10 anos de idade, com indicação clínica de Rotavírus *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36:421-423.
- TASHIMA, N.T., SIMÕES, M.J.S., 2004. Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Western São Paulo - UNIOESTE clinical laboratory, Presidente Prudente, São Paulo State, Brasil. *Rev. Instituto Medicina Tropical São Paulo*, 46:243-248.
- TASHIMA, N.T., SIMÕES, M.J.S., LEITE, C.Q., FLUMINHAN, A., NOGUEIRA, M.A, MALASPINA, A.C., 2009. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Revista Instituto Medicina São Paulo*, 51:19-24.
- TÉO, C.R.P.A., 2002. Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. *Arquivo Ciências Saúde – UNIPAR*, 6(3):135-40.
- TOMPS, S.R. 1998. Estudo epidemiológico da criptosporidiose e sua associação com as condições de saneamento ambiental no distrito municipal de Perus, São Paulo. 103p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Mackenzie, São Paulo.
- TRAVIEZO-VALLES, L., *et al.*, 2004. Contaminacion enteroparasitaria de lechugas expendidas en mercados del estado Lara. Venezuela. *Parasitologia Latinoamericana*, 59:167-170.




- THALES, A.B., DANIELA, V.C., SILVA, G.A.V., LOPES, P.B., BARROS, R.F., RIBEIRO, G.P., NEUBERT, L.F., BARÇANTE, J.M.P., 2008. Enteroparasitos em crianças matriculadas em creches públicas do município de Vespasiano, Minas Gerais. *Revista de Patologia Tropical*, 37:33-42.
- THURSTON-ENRIQUEZ, J.A., WATT, P., DOWD, S.E., ENRIQUEZ, R., PEPPER, I.L., GERBA, C.P., 2002. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *Journal of Food Protection*, 65:378–382.
- THOMPSON, R.C.A., LYMBERY, A.J., MELONI, B.P., 1990. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882 taxonomic and epidemiological significance. *Protozool Abstract*, 4:1-28.
- THOMPSON, R.C.A., HOPKINS, R.M., HOMAN, W.L., 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, 16:210-213.
- THOMPSON, R.C.A., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitol*, 126:15-35.
- THOMPSON, R.C.A., MONIS, P.T., 2004. Variation in *Giardia*: implication for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*, 58:69-137
- UCHÔA, C.M.A., LOBO, A.G.B., BASTOS, O.M.P., MATOS, A.D., 2001. Parasitos intestinais: prevalência em creches comunitárias da Cidade de Niterói, Rio de Janeiro – Brasil. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 60: 97-101.
- UCHÔA, C.M.A., ALBUQUERQUE, M.C., BASTOS, O.M.P., SILVA, D.G., SILVA, P., 2004. Enteroparasitoses em crianças de creche. Niteroi, Rio de Janeiro – Brasil. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária* - Belo Horizonte.
- UPCROFT, P., UPCROFT, J.A., 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:150-164.
- VITOR, R.W., 2000. A Protozoa. In: NEVES, DP (Org). *Parasitologia Humana* (10 Ed.) São Paulo: Atheneu, cap.5, p.24-26.
- ZAIDEN, MF; SANTOS, BMO; CANO, MAT; NASCIF JUNIOR, IA., 2008. Epidemiologia das parasitoses intestinais em crianças de creches de Rio Verde-GO. *Revista de Medicina*, Ribeirão Preto, 41:182-7.
- WHARTON, M., SPIEGEL, R.A., HORAN, J.M., TAUXE, R.V., WELLS, J.G., BARG, N., 1990. A large outbreak of antibiotic-resistant shigellosis at a mass gathering. *The Journal of Infectious Diseases*, 162:1324-1328.
- WHO, 1979. Report of a WHO Expert Committee whit the participation of FAO. Report. Geneva; (WHO - Technical Report Series, 637).
- WHO, 1981. Intestinal protozoan and helminthic infections. Report. Geneva; 1981. (WHO - Technical Report Series, 58:666-6671).

## 10. ANEXOS

### 10.1. Questionário aplicado aos participantes deste estudo

DADOS PESSOAIS					
RG:					
NOME:					
SEXO:	( ) MASC.	( ) FEM.			
NASCIMENTO:					
ALTURA (m):					
PESO (kg):					
NOME RESPONSÁVEL:					
PRESENÇA DE SINTOMAS					
ASSINTOMÁTICO	( ) SIM	( ) NÃO			
FEBRE	( ) SIM	( ) NÃO			
DIARREIA	( ) SIM	( ) NÃO			
DOR ABDOMINAL	( ) SIM	( ) NÃO			
CEFALEIA	( ) SIM	( ) NÃO			
VÔMITOS	( ) SIM	( ) NÃO			
QUANTO A USO DE MEDICAÇÃO E ANÁLISE COPROLÓGICA					
JÁ FEZ EXAMES DE FEZES ALGUMA VEZ?			( ) SIM	( ) NÃO	
FAZ USO DE MEDICAÇÃO			( ) SIM	( ) NÃO	
ALBENDAZOL	( ) SIM	( ) NÃO			
MEBENDAZOL	( ) SIM	( ) NÃO			
MANSIL	( ) SIM	( ) NÃO			
IVERMECTINA	( ) SIM	( ) NÃO			
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS					
QUAL TIPO DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA NA RESIDÊNCIA?					
ENCANADA	( ) SIM	( ) NÃO			
POÇO	( ) SIM	( ) NÃO			
QUAL DESTINO DO ESGOTO?					
CÉU-ABERTO	( ) SIM	( ) NÃO			
FOSSA	( ) SIM	( ) NÃO			
POSSUEM ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO?					
CÃO	( ) SIM	( ) NÃO			
GATO	( ) SIM	( ) NÃO			
EFETUA LAVAGEM DAS MÃOS ANTES DAS REFEIÇÕES E APÓS USO DE SANITÁRIO?					
ANTES DAS REFEIÇÕES	( ) SIM	( ) NÃO			
APOS USO WC	( ) SIM	( ) NÃO			
QUAL A FORMA DE BANHAR-SE?					
CHUVEIRO	( ) SIM	( ) NÃO			
BALDE	( ) SIM	( ) NÃO			
BASE ALIMENTAR					
MAMA	( ) NÃO	( ) NÃO			
MAMADEIRA	( ) NÃO	( ) NÃO			
ALIMENTOS PASTOSOS	( ) NÃO	( ) NÃO			
ALIMENTOS SÓLIDOS	( ) NÃO	( ) NÃO			

## 10.2. Ficha do doente

<b>CONSULTA MÉDICA &amp; EXAME DE FEZES</b>		 <b>IHMT</b> Instituto de Higiene e Medicina Tropical UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA	
<b>FICHA DO PACIENTE</b>			
<b>CÓDIGO:</b>			
<b>NOME:</b>			
1ª AMOSTRA		SITUAÇÃO	
<b>DATA ENTREGA</b>			
2ª AMOSTRA		SITUAÇÃO	
<b>DATA DA ENTREGA</b>			
3ª AMOSTRA		SITUAÇÃO	
<b>DATA DA ENTREGA</b>			
ENTREGA DO RESULTADO DO EXAME		/ /	
CONSULTA MÉDICA		/ /	

### 10.3. Instruções para colheita de fezes

#### INSTRUÇÕES PARA A COLETA DE PARASITOLÓGICO DE FEZES

##### PROCEDIMENTOS:

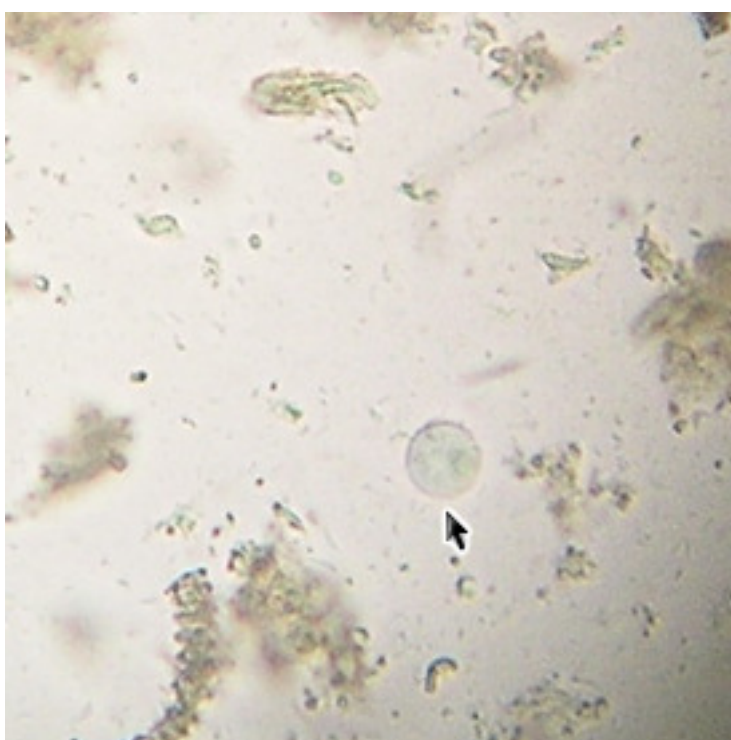
1. Antes de coletar as fezes, se necessário, urinar no vaso sanitário para evitar a contaminação do material.
2. Evacuar em vasilhame limpo e seco, não contaminando as fezes com urina.
3. Após a coleta, retirar uma pequena quantidade de fezes em diferentes partes do material (início, meio, fim) e colocar no recipiente fornecido.
4. Coletar amostras de fezes para encher no máximo até metade do recipiente.
5. Evitar utilizar laxantes.
6. Transportar a amostra em até uma hora após a coleta para o lugar e horário combinado para ser recolhida. Caso não seja possível, o material pode ser mantido em refrigeração por até 12 horas.

Siga corretamente as instruções. Qualidade do seu exame também depende de você.

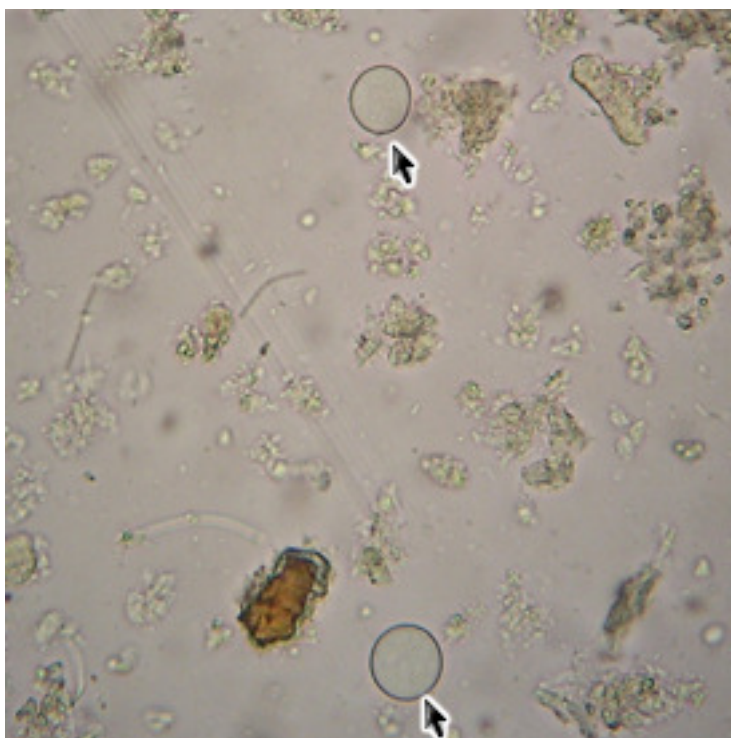
## APÊNDICE A: FIGURAS

As fotos seguintes foram registradas, pelo autor, ao longo das análises coprológicas no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e visitas na creche e comunidade.

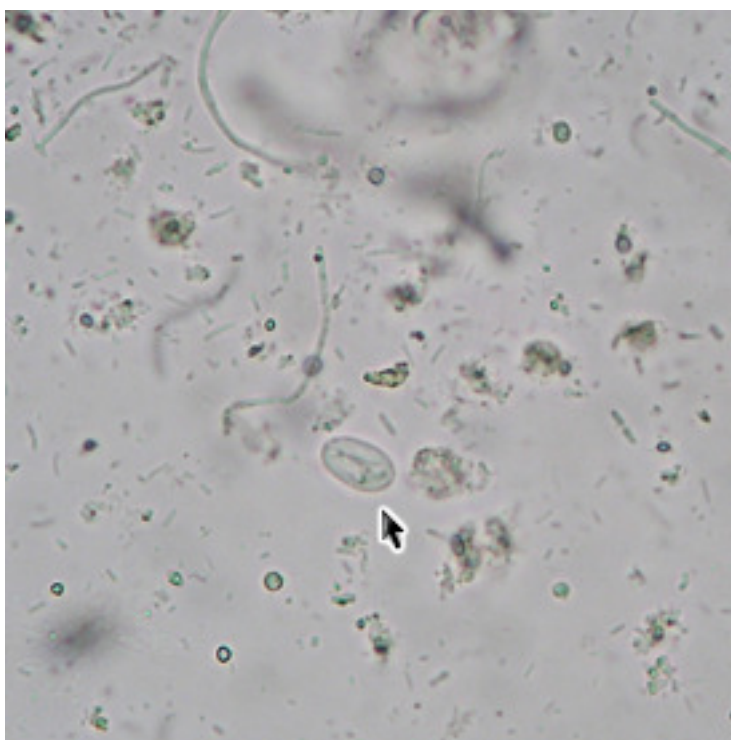
**FIGURA 7:** *Entamoeba histolytica*



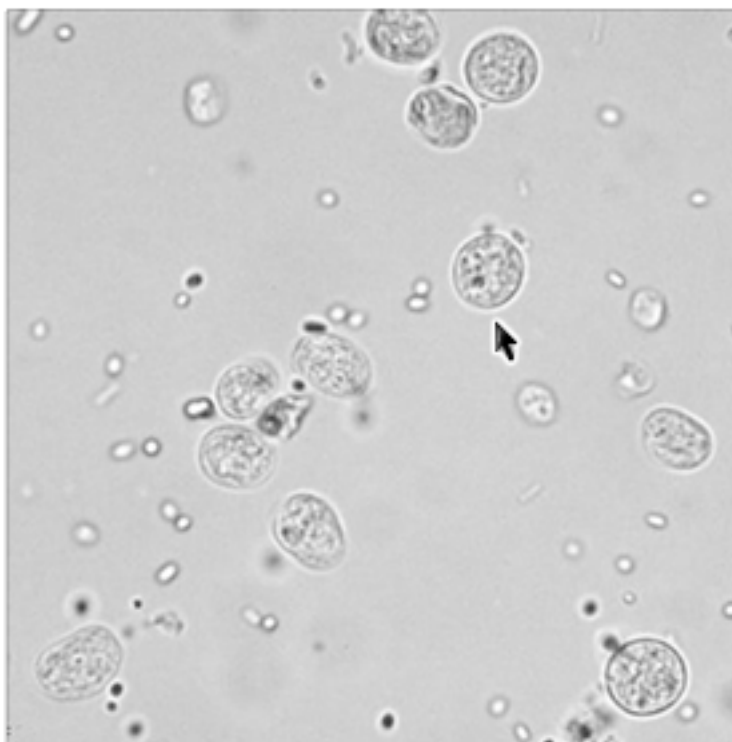
**FIGURA 8:** *Entamoeba coli*



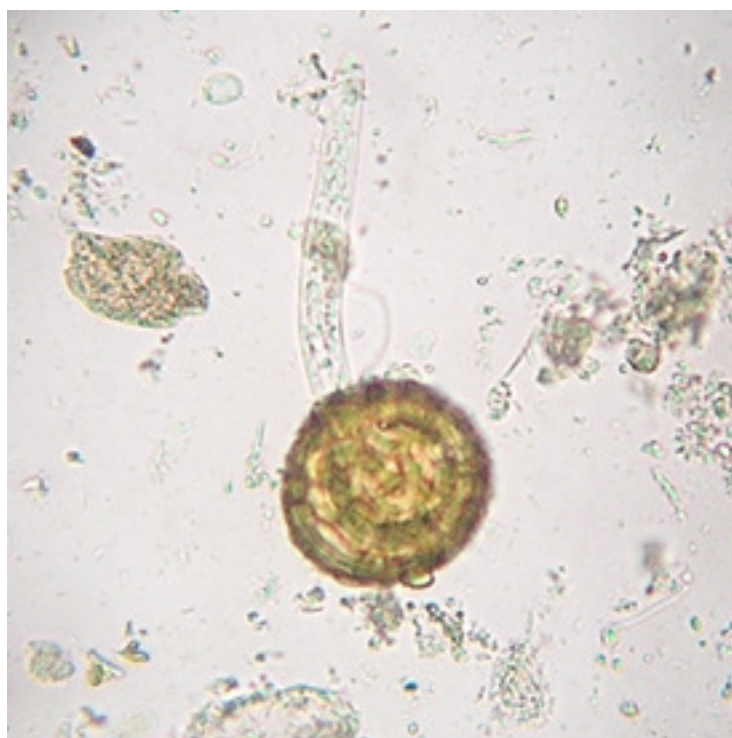
**FIGURA 9:** *Giardia duodenalis*



**FIGURA 10:** *Endolimax nana*

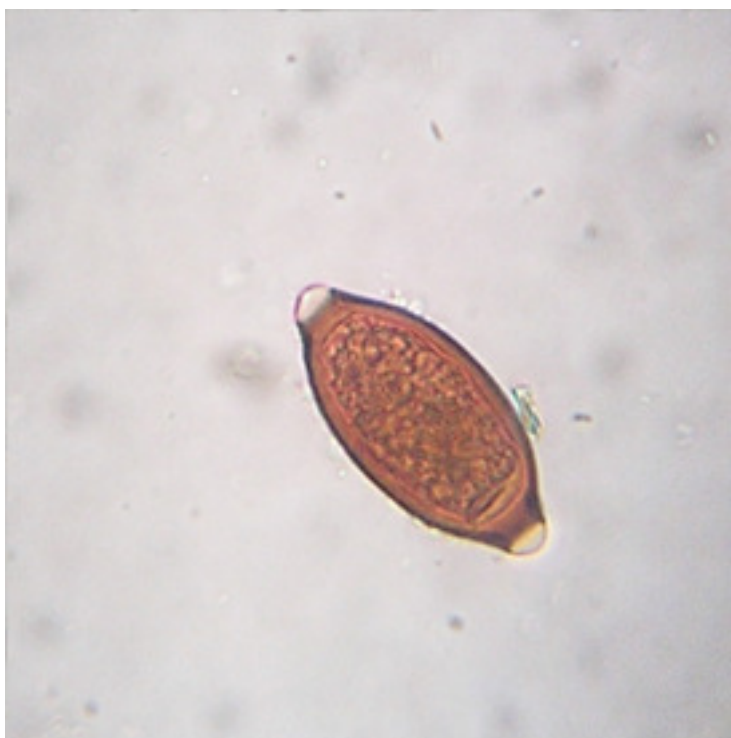


**FIGURA 11:** *Ascaris lumbricoides*





**FIGURA 12:** *Trichuris trichiura*



**FIGURA 13:** Comunidade Entra A Pulso – Esgoto a céu-aberto





**FIGURA 14:** Comunidade Entra A Pulso – Esgoto a céu-aberto



**FIGURA 15:** Comunidade Entra A Pulso – Edifícios do bairro de Boa Viagem



**FIGURA 16:** Comunidade Entra A Pulso – Presença de animais



**FIGURA 17:** Creche Nossa Senhora da Boa Viagem





**FIGURA 18:** Creche Nossa Senhora da Boa Viagem – Parque de recreação



**FIGURA 19:** Creche Nossa Senhora da Boa Viagem – Refeitório



**FIGURA 20:** Creche Nossa Senhora da Boa Viagem – Reunião com pais e/ou responsáveis pelas crianças e atendimento médico

